Q
33
A6X
NH

ANALES

DE LA

SOCIEDAD CIENTIFICA

ARGENTINA

DIRECTOR : Dr. ANDRES O. M. STOPPANI

NUMERO ESPECIAL
EN HOMENAJE AL DOCTOR LUIS FEDERICO LELQIR
PREMIO NOBEL DE QUIMICA AÑO 1970

SUMARIO

BUENOS AIRES
AVDA. SANTA FE 1145

1971



SOCIEDAD CIENTIFICA ARGENTINA

SOCIOS HONORARIOS

Ing. Enrique Butty
Dr. Luis F. Leloir
Dr. Selman Waksman
Dr. Florentino Ameghino †
Dr. Valentín Balbín †
Ing. Santiago E. Barabino †
Dr. Carlos Berg †
Dr. Germán Burmeister †
Ing. Vicente Castro †
Ing. Enrique Chanourdie †
Dr. Carlos Darwin †

Dr. Alberto Einstein †
Dr. Enrique Ferri †
Dr. Angel Gallardo †
Dr. Benjamín A. Gould †
Dr. Cristóbal M. Hicken †
Dr. Eduardo L. Holmberg †
Dr. Bernardo A. Houssay †
Ing. Luis A. Huergo †
Ing. Eduardo Huergo †
Dr. Mario Isola †
Dr. Juan J. J. Kyle †

Dr. César Lombroso †
Ing. Guillermo Marconi †
Dr. J. Mendizábal Tamborel †
Dr. Walter Nernst †
Dr. R. A. Phillippi †
Dr. Guillermo Rawson †
Dr. Alfredo Sordelli †
Dr. Carlos Spegazzini †
Dr. Pedro Visca †
Dr. Estanislao S. Zeballos †

JUNTA DIRECTIVA

(1970-1971)

Presidente.......... Cap. de Navío (R.) Emilio L. Díaz
Vicepresidente 1º.......... Dr. Roberto F. Recoder
Vicepresidente 2º.......... Ing. Agr. Juan J. Burgos
Secretario.......... Ing. Agr. Eduardo Pous Peña
Prosecretario.......... Dr. Horacio E. Bosch
Tesorero.......... Dr. Benito S. Colqui
Bibliotecario.......... Dr. Horacio H. Camacho

Vocales Titulares:

Ing. Lucio R. Ballester
Ing. Eduardo Braun Cantilo
Ing. Pablo R. Gorostiaga
Ing. Eitel Hernani Lauria
Dr. Martiniano Leguizamón Pondal
Clmte. (R) Rodolfo N. M. Panzarini
Ing. Agr. Enrique M. Sívori
Dr. Andrés O. M. Stoppani
Dr. Julio V. Uriburu

Vocales Suplentes

Ing. Andrés E. Garlan
Cap. de Corb. (R) Néstor C. L. Granelli
Dr. Carlos A. Márquez
Dr. Ricardo Negroni
Dr. Jorge R. A. Vanossi

SECCIONES DEL INTERIOR

Comisión Directiva

San Juan

Presidente
Doctor Indalecio Carmona Ríos
Vicepresidente
Ingeniero Fernando Volponi
Secretario
Profesor César H. Guerrero
Tesorero
Doctor Duilio S. Graffigna
Vocales Titulares
Doctor Antonio Aguilar
Ingeniero Santiago S. Graffigna
Ingeniero Luis Autard
Vocales Suplentes
Doctor Pablo Alberto del Carril
Doctor Emilio Maurin Navarro
Ingeniero Humberto Quiroga Echegaray
Ingeniero Jorge G. de Luca
Revisores de Cuentas
Ingeniero Emilio L. Romito
Ingeniero Enrique Gatti
Enólogo Alberto Baistrocchi

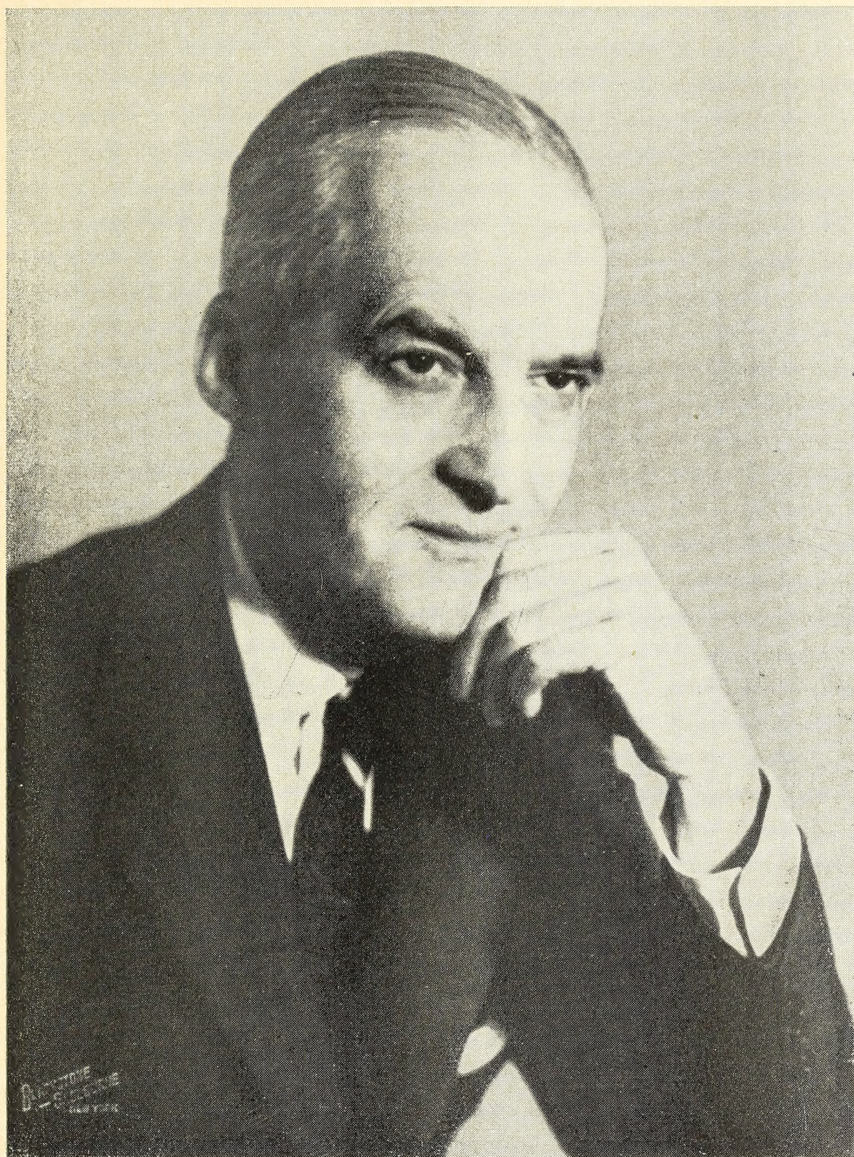
Santa Fe

Presidente
Dr. Argentino A. Bonetto
Vicepresidente
Dr. Ezio Emiliani
Secretario
Prof. Clarice T. Pignalberi
Tesorero
Ing. Quím. Enrique A. Virasoro
Vocales
Ing. Quím. Guillermo Berraz
Ing. José M. Parera

La Plata

Presidente
Ing. Roberto Diego Cotta
Vicepresidente
Ing. Camilo B. Rodríguez
Secretario
Dr. Luis M. Boggia
Prosecretario
Ing. Horacio C. Albina
Tesorero
Dr. Teodoro G. Krenkel
Protesorero
Ing. Pedro Diego Jensen
Vocales
Dr. Max Birabén, Dr. Homero Bibiloni, Dr. Jorge J. Ronco, Dr. Rodolfo Disalvo, Dra. Ives L. Danna, Ing. Aaron Beilinson e Ing. José G. Romano Yalour.

Impreso en Imprenta Coni S.A.C.I.F.I., Perú 684, Buenos Aires, República Argentina



Dr. LUIS FEDERICO LELOIR

DR. LUIS FEDERICO LELOIR

SOCIO HONORARIO DE LA SOCIEDAD CIENTIFICA ARGENTINA

Por resolución de sus cuerpos estatutarios la Sociedad Científica Argentina ha designado Socio Honorario al Doctor Luis Federico Leloir, distinción excepcional, otorgada sólo a figuras científicas de gran relevancia, como Ameghino, Nernst, Einstein, y Houssay.

La designación de Leloir reconoce una obra realizada sin otra meta que la búsqueda de la verdad, con resultados brillantes, que han servido de inspiración a innumerables investigadores en los centros científicos más famosos del mundo. En su obra, Leloir ha revelado maestría para hallar motivos fundamentales, sencillez y elegancia en los métodos, lucidez para resolver problemas complejos y perspicacia para desarrollar nuevas y trascendentes líneas de trabajo.

Las distinciones y honores que Leloir ha recibido en el transcurso de su vida no han hecho mella en su natural modestia. Su personalidad, muy porteña, es sencilla, cordial y accesible. Pero en sus juicios es cauto, certero, imparcial y optimista, virtudes que hacen de él un excelente consejero y administrador científico como lo reveló su actuación en el Directorio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Leloir se graduó en medicina en 1932. Poco después se incorporó al Instituto de Fisiología que dirigía Bernardo A. Houssay a partir de ese momento decidió su destino. Las primeras investigaciones sobre el metabolismo del glucógeno

le revelaron seguramente problemas innaccesibles para los métodos de la fisiología clásica y por ello, Leloir buscó en la bioquímica una vía más directa y exacta hacia los fenómenos fundamentales de la biología celular.

En 1936 concurre al laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, centro de gran prestigio que dirigía Gowland Hopkins. Allí realiza una labor sobresaliente en enzimología y en metabolismo de ácidos grasos, con Green, Dixon y Edson. En 1937 regresa a la Argentina, iniciando en el Instituto de Fisiología estudios de bioquímica fundamental, con equipos que él mismo trajo de Inglaterra. De 1937 a 1943 investiga con Muñoz el metabolismo del alcohol y de las grasas, trabajos que los llevarían a aislar por primera vez, partículas subcelulares capaces de catalizar la oxidación completa de los ácidos grasos. Se lo veía entonces trabajar con tranquila tenacidad, en un espacioso laboratorio del sótano del Instituto de Fisiología, unas veces manipulando vidrio para hacer un homogenizador, otras improvisando una centrífuga refrigerada, a menudo incubando cortes de tejidos en un termostato de regulación incierta, o bien recostado en una « chaisse-long » que para su comodidad y la de sus colegas había colocado frente a dos aparatos de Warburg, que constituían la riqueza instrumental del laboratorio. Siempre dispuesto a dar un consejo sensato, una sugestión fértil, una bibliografía poco común, o algún reactivo muy especial, habitualmente preparado por él. En cambio, Leloir era poco proclive a la conferencia fácil, la clase rutinaria, o la comunicación trivial a sociedades o congresos.

El aislamiento de preparaciones subcelulares capaces de oxidar totalmente los ácidos grasos *in vitro* habría dado a Leloir lugar definitivo en la historia de la bioquímica. Sin embargo, otro tema fundamental, la hipertensión, atrajo tam-

bién su interés en aquella época. Así, con Braun Menendez, Fasciolo, Muñoz y Taquini, realizaron obra de valor definitivo al dilucidar el mecanismo humoral de la hipertensión arterial nefrogena.

Los acontecimientos políticos de 1943 conmovieron a la universidad e indirectamente causaron la desintegración del Instituto de Fisiología. Esos acontecimientos debieron producir graves conflictos en el espíritu sereno y razonador de Leloir. El Instituto de Fisiología estaba entonces en pleno florecimiento y es fácil adivinar cuan rápido y extenso hubiera sido el progreso de la bioquímica argentina si otro hubiera sido el curso de la historia. Sin embargo, Leloir no se apartó de su destino. Se fue a los Estados Unidos donde trabajó en 1944 y 1945 con Green y Hunter, con excelentes resultados. En 1946 regresó para encontrar nuevas y más difíciles circunstancias que las que había dejado al partir. Fácil le hubiera sido entonces expatriarse y encontrar medios mas propicios para su labor, pues su ya sólido prestigio le habría las puertas de los mejores laboratorios del mundo. Pero optó por quedarse, con Houssay en el Instituto de Medicina y Biología Experimental, para iniciar poco después el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de la Fundación Campomar. Precisamente, en esos años de penuria de medios y dificultades aparentemente insuperables, Leloir inicia un nuevo capíiulo de su obra científica, el mas importante, al descubrir con Caputto, Cardini, Paladini y Trucco los nucleótidos azúcares y su papel fundamental en las reacciones de transferencia de los grupos glucosilos. Esos hallazgos, realizados en el vetusto edificio de la calle Julián Alvárez, en condiciones de increible pobreza material, permitieron al mismo Leloir y a los que lo siguieron en su trabajo aclarar mecanismos metabólicos esenciales en animales, plantas y bacterias, como la biosíntesis del glucógeno, el almidón, la

celulosa, los mucopolisacáridos, los aminazúcares y ácidos urónicos, los polisacáridos antigénicos y de pared, y las reacciones de conjugación de drogas. Algunos de esos estudios tuvieron transcendencia para la fisiopatología de enfermedades como la galactosemia y las denominadas disglucogenosis.. Pocas veces en la historia de la bioquímica, hallazgos logrados en la mayor modestia experimental han tenido tanta repercusión.

Son muy numerosas las distinciones que ha recibido Leloir por su fructífera y abnegada labor científica. Se deben destacar los premios Nobel de Química de 1970, Benito Juarez del Gobierno de México de 1967, Louisa Gross Horowitz de la Universidad de Columbia, Nueva York, los premios de las Fundaciones Bunge y Born, Severo Vaccaro, de la Sociedad Científica Argentina y de la Asociación Química Argentina. Es miembro de las Academias Pontificia de Ciencias, de la National Academy of Sciences de los Estados Unidos, y en la Argentina, de la Academia Nacional de Medicina y de Ciencias Exactas Físicas y Naturales.

Al designar Socio Honorario a Luis Federico Leloir, la Sociedad Científica Argentina ha procedido de acuerdo a sus mejores tradiciones pues ha reconocido la labor de un hombre de ciencia excepcional, las virtudes de un caballero sin tacha y el mérito de quien, en el silencio del laboratorio, logró como su maestro Bernardo A. Houssay, llevar el prestigio de la ciencia argentina a los más altos niveles.

La Sociedad Científica Argentina con motivo del Premio Novel otorgado a Leloir y su designación como Socio Honorario ha editado el presente número especial de los Anales.

Andrés O. M. Stoppani

CURRICULUM VITAE DE LUIS FEDERICO LELOIR

Fecha de nacimiento : 6 de septiembre de 1906, Paris, Francia. Argentino por opción.

1930-31	Practicante menor del Hospital Ramos Mejía.
1932	Practicante mayor del Hospital Ramos Mejía.
1932	Doctor en Medicina, Universidad de Buenos Aires.
1934	Médico agregado a la sala IV del Hospital de Clínicas.
1934	Premio Facultad a la mejor Tesis.
1934-35	Ayudante de investigaciones, honorario, en el Instituto de Fisiología (Prof. Bernardo A. Houssay).
1936	Asistente al Biochemical Laboratory, Cambridge, Inglaterra (Prof. Hopkins).
1937-43	Ayudante de Investigaciones, Instituto de Fisiología, (Prof. Bernardo A. Houssay).
1941	Aspirante a Profesor de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas, Buenos Aires.
1944	« Research Associate », Departamento de Farmacología, Universidad de Washington, St. Louis, USA (Prof. C. Cori).
1944-45	Investigador en el Enzyme Research Laboratory, College of Physicians and Surgeons, New Yerk (Prof. D. E. Green).
1942-44	3° Premio de la Comisión Nacional de Cultura (en colaboración).
1946	1° Curso de Docencia Complementaria, Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Buenos Aires, interrumpido por renuncia.
1946	Investigador en el Instituto de Biología y Medicina Experimental.
1947-65	Director del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Buenos Aires.
1950	Premio de la Sociedad Científica Argentina, rama Biología.
1958	Premio de la Fundación Helen Hay Whitney, USA.
1958-59	Presidente de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias.
1958-64	Miembro del Directorio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
1958-65	Profesor Extraordinario de Investigaciones, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires.
1960	« Foreign Member » de la National Academy of Sciences, USA.

1961	« Foreign Member » de la American Academy of Arts and Sciences.
1961	Miembro de la Academia Nacional de Medicina.
1962	Premio de la Fundación Severo Vaccaro (Argentina).
1962-65	Jefe del Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires.
1963	« Foreign Member » de la American Philosophical Society.
1963	Miembro « honoris causa » de la Universidad de Paris, Francia.
1963	« Hopkins Memorial » cuarta conferencia, Oxford, Inglaterra,
1964	Conferenciante plenario, 6° Congreso Internacional de Bioquímica, Nueva York.
1965	Premio de la Fundación Bunge y Born, Argentina.
1966	Miembro Honoris Causa de la Universidad de Granada, España.
1966	Miembro « Honoris Causa » de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
1966	« Opening Lecture », Symposium sobre « Enzymatic aspects of Metabolic Regulation » México.
1966	Premio de la Cairduer Foundation, Canada.
1967	Premio « Louisa Gross Lorowitz », Universidad de Columbia, New York.
1967	Premio « Benito Juarez », Gobierno de México, México.
1968	Miembro de la Academia Pontificia de Ciencias, Ciudad del Vaticano.
1968	Miembro « Honoris Causa » de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
1968-70	Miembro del Directorio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.
1969	Miembro Honorario de la Biochemical Society, Inglaterra.
1969	Premio Juan J. J. Kyle, Asociación Química Argentina.
1970	Miembro de la Société de Biologie, Paris, Francia.
1970	Premio Nobel de Química, Suecia.
1971	Presidente Honorario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

HISTORIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS

Por JOSE M. OLAVARRIA y PORRUA
Instituto de Investigaciones Bioquímicas « Fundación Campomar »

La historia del IIB, desde el punto de vista de la anécdota, de la gente que pasó por sus laboratorios, de los resultados científicos y de los premios con que éstos fueron reconocidos, han sido tema de muy buenos artículos, y no creo que valga la pena reiterar lo ya dicho.

En cambio puedo explorar otra faceta muy interesante, la del espíritu del IIB, la de esa forma de ser que en mayor o menor grado se ha contagiado a cuantos han convivido en sus laboratorios. Ese espíritud del cual deviene su tradición y su prestigio. Ese espíritu que ha dado al IIB su característica de evento raro en la historia de la ciencia argentina. Ese espíritu que independientemente de los éxitos científicos, es una deuda más con Luis F. Leloir y el núcleo inicial de investigadores.

El problema realmente asusta, pero la experiencia de IIB parece un ejemplo tan necesario para el país en cualquiera de sus niveles, que creo vale la pena intentar, aunque no consiga otra cosa, que dejar planteado el caso.

Honestidad a ultranza, voluntad, estoicismo y responsabilidad; son las características que componen, con múltiples matices el clima imperante desde hace más de veinte años en el IIB. ¿Cómo fue el comienzo? ¿Cómo aquel grupo inicial consiguió crear ese clima? No puedo decirlo sin pecar de fantasioso. En cambio, cuál era el espíritu del instituto a los nueve años de su creación, y cómo se conservó hasta la fecha, son cosas de las que puedo dar fe y analizar con la autoridad —si esto vale— de testigo presencial.

Ese espíritu que impresionó tan vivamente a cuantos tuvimos la posibilidad de conocerlo, como para que el impacto de esa admi-

ración nos comprometiera inconscientemente a tratar de conservarlo, muchas veces, aún a pesar de nuestras propias debilidades.

Un espíritu que lleva a individuos comunes, con los mismos defectos y virtudes del ciudadano medio a superarse en la integración del fenómeno social que se llama IIB. Donde cada uno da de sí lo mejor que tiene.

HONESTIDAD. Este término, con mayúscula, es una de las características del IIB. Honestidad, tanto en el terreno científico, como en la ecuanimidad para tolerar opiniones antagónicas y reconocer errores, es una de las enseñanzas que se reciben al convivir en el IIB.

Para un joven educado en el imagen de un "Magister omnisapiente e insuperable" expresiones como: "la verdad es que de esto yo no se nada" o "esto no lo entendí nunca muy bien" o "a mi nunca me salieron tan bien como a Ud. las curvas de calibración", etcétera, le hacen comprender que ha entrado en Utopía, donde la verdad es la ley y la autocrítica se exagera en un intento de estimular al principiante.

Las reuniones a la hora del almuerzo merecerían un capítulo aparte. En algunos aspectos podrían compararse con las más clásicas formas de la democracia ateniense. Entre bocado y bocado, o entre trago y trago (de mate cocido) todo el mundo tiene derecho a la palabra, la crítica no es ofensa, y todo el mundo tiene derecho a ella. Además de las discusiones sobre temas específicos, donde se analizan trabajos propios y ajenos, se tratan los asuntos más dispares, se enfrentan las opiniones más opuestas.

Muchas veces lo agrio e incisivo del debate asusta al recién iniciado, pero la vivacidad y el ardor en la defensa de las opiniones cede lugar, a corto plazo, a la moderación y al respeto de la opinión ajena.

VOLUNTAD. La voluntad de trabajo es el motor del IIB. Quién recién entra al instituto se encuentra desde el primer día trabajando, codo con codo, por así decirlo, con el resto de los integrantes del mismo; no se hacen diferencias, no hay oficinas ni despachos cerrados (directamente no hay despacho), no hay disculpas burocráticas. El ritmo de trabajo es estimulante, el director trabaja a la par del becario y lo que es aún más estimulante, al discutir los resultados, preguntas como: "¿y ahora, qué le parece que hagamos?". Todos son iguales en el momento de los trabajos menos gra-

tos, si es que los hay, y los más antiguos o de más jerarquía, son los que los soportan en mayor proporción. ¿Quién es capaz de resistir sin imitarlos, ejemplos como el de un director del instituto acomodando el depósito, armando una estantería, o arreglando un aparato descompuesto un sábado por la tarde?

La voluntad es también de progreso. El IIB está permanentemente tratando de superarse, de estudiar nuevas posibilidades, de ampliar el espectro de las mismas. Generalmente va más allá de lo interno, de lo puramente científico, hay angustia de evolución nacional. El tema martillea en las reuniones del mediodía desde hace muchos años, pero no hay canales de comunicación y construirlos, involucraría: promoción, autopropaganda, cabildeos y política de comité. No hay tiempo, ni el espíritu del IIB lo toleraría, hay que seguir trabajando y formando gente.

Estoicismo. Ese estoicismo tan necesario para soportar sin desmayo las diarias frustraciones. Al hablar de frustraciones no me refiero solamente a los experimentos fallidos o a las hipótesis que resultaron falsas, pues estos son "gajes del oficio", ni tampoco en un terreno más general, a aquellas frustraciones que compartimos con todos los argentinos a lo largo de tantos años. Me refiero principalmente a la frustración de ver tantos planes rodar por el suelo, del fracaso cuando no la tergiversación de tantos proyectos, así como la de ver cerrarse tantas veces las vías de comunicación para los investigadores del IIB.

Antes dije que los problemas del desarrollo y la evolución del país son temas de todos los días en el IIB, pero más aún los relacionados con la educación, la universidad y la investigación. A este respecto ¡se han discutido tantas ideas y elaborado tantos proyectos! Un continuo descartar y reelaborar, que dependía la mayor parte de las veces de los vaivenes políticos, universitarios o de la administración científica que tan frecuentemente ha soportado nuestro país.

La vida del IIB ha sido un continuo discurrir y elaborar sobre formas mejores y más eficientes de Universidad, sobre una Universidad moderna, libre de mitos y "monstruos sagrados". Buscando una Universidad más formativa, mejor informada, capaz de una más eficiente transferencia, de una mayor honestidad y un más riguroso método científico. Método que no sólo debería aplicarse en la enseñanza y la investigación, sino en todos los aspectos del funcionamiento y en la convivencia dentro de la institución. Aspi-

rando a una Universidad libre del arcaico enciclopedismo, de estructura elástica, capaz de aprovechar la experiencia de los errores, y de adecuarse permanentemente a la realidad y el momento.

Desafortunadamente, las posibilidades de ensayos y realizaciones de este tipo quedaron siempre limitadas al ámbito del instituto. En lo exterior, en el resto del ambiente universitario, la influencia es mínima y siempre ha sido bien controlada. Como ejemplo de esto último baste recordar que muy recientemente, en las últimas elecciones universitarias, los investigadores del IIB pertenecientes a la UNBA fueron excluidos del proceso eleccionario. La vida del IIB, desde que fuera fundado en 1947 por Jaime Campomar, ha sido un continuo elaborar proyectos de expansión, como única forma de poder recibir y formar más gente. Las únicas realidades importantes hasta el momento fueron el generoso apoyo del Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública en 1958 que brindó el actual local de la calle Obligado, y la Asociación con la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires que aseguró un incremento del capital humano: doctorandos, docentes e investigadores.

Por su prestigilo el IIB constituyó siempre el *señuelo perfecto*, para encabezar planes que, huérfanos de prestigio propio necesitaban del ajeno para asegurar sus metas.

Responsabilidad. Este es el elemento fundamental que junto a la voluntad de progreso y de lucha, contrarrestra el elemento apático del estoicismo, convirtiendo la filosófica resignación, en científica búsqueda de nuevos caminos para resolver el problema. La misma responsabilidad que lleva a buscar continuamente soluciones a las múltiples dificultades que surgen cotidianamente en el quehacer científico. La misma responsabilidad que lleva una y otra vez a buscar la verdad de hipótesis "ya probadas", o a buscar hipótesis alternativas. Esa misma responsabilidad es la que obliga a no ceder en el empeño, a hacer todos los esfuerzos sin tener en cuenta el tiempo invertido, para tratar de elevar el nived científico y universitario del país, pese a todos los obstáculos, pese a todos los intereses.

Pero lo que es más importante aún, y más característico del IIB, es que toda esta tarea se realiza sin abandonar la labor específica, mientras más esfuerzo se invierte en la tarea común, más esfuerzo se dedica al propio trabajo. Vigilando siempre de no caer en el

mal ejemplo de que el exceso de tareas extracientíficas pueda justificar el abandono de las pipetas.

En resumen, el IIB es el ejemplo de un modo de gobernar, de máxima liberalidad, pero que, superándose en lo formativo del ejemplo logra la integración de sus componentes en una estructura biológicamente bastante estable, funcionalmente muy eficiente, aún cuando socialmente muy poco probable.

LOS NUCLEOTIDO-AZUCARES

SINTESIS QUIMICA

Por EDUARDO RECONDO

Departamento de Química Biológica Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

---

RESUMEN

Se hace una revisión de los métodos utilizados para la síntesis química de los nucleótido-azúcares.

Se detalla el método de Khorana y su aplicación en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas a la síntesis de adenosina-difosfato-glucosa (ADPG) y otros análogos del uridina-difosfato-glucosa (UDPG).

Lo conocí a Luis Federico Leloir a fines de marzo de 1960. Yo había llegado hacia poco tiempo de los EE. UU. y vacilaba en esos días entre volver a ese país o quedarme en la Argentina. A través de Carminatti me enteré que en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas había interés en incorporar a alguien con experiencia en síntesis orgánicas. En esos momentos Leloir con Cardini y María Fekete estaban trabajando en la biosíntesis del almidón y habían encontrado una enzima de porotos que incorporaba glucosa del UDPG al almidón (1). Pero también habían verificado que el UDPG no era un buen dador de glucosa pues poseía una constante de afinidad (Km) demasiado alta (2).

La idea de Leloir era que quizás el verdadero sustrato para esa enzima fuese un análogo del UDPG y había pensado inicialmente en el UDP-maltosa con la esperanza de que la biosíntesis del almidón se realizara de a dos unidades de glucosa por vez. Es decir que nuestra tarea específica iba a ser intentar la síntesis química de análogos del UDPG comenzando por el UDP-maltosa.

El UDPG fue descubierto en 1950 [3] y en 1956 Michelson y Todd en Inglaterra realizaron por primera vez su síntesis química [4] adaptando y modificando técnicas ya conocidas de la química orgánica. Partieron de la uridina (fig. 1); bloquearon selectivamente el hidroxilo 5′ de la ribosa con un grupo tritilo (trifenilmetano) e introdujeron dos grupos fácilmente eliminables en los hidroxilos 2′ y 3′ (bencilos). Por eliminación del grupo tritilo pudieron atacar nuevamente el hidroxilo 5′ con un reactivo fosforilante adecuadamente bloqueado, para obtener finalmente el cloruro del ácido fosfórico correspondiente (fig. 2). Por condensación de este compuesto con la sal de trioctilamonio del glucosa-1-fosfato (fig. 3), en solución bencénica y eliminación de los grupos bencilos protectores por hidrogenólisis obtuvieron finalmente el UDPG (fig. 4).

El método utilizado aunque era muy elegante y confirmaba una vez más la estructura química del UDPG resultaba largo y tedioso por el número de intermediarios que era necesario preparar y por otra parte en la eliminación de los grupos protectores se hidrolizaba parcialmente la unión pirofosfato del nucleótido-azúcar con la consiguiente disminución del rendimiento final (15 %).

El mismo grupo de trabajo utilizó también una segunda vía que consistió en la condensación directa de los dos mono ésteres del ácido fosfórico correspondiente (glucosa-1-fosfato y uridina-5′-fosfato), sin protección alguna, en presencia de agentes deshidratantes como las carbodiimidas o el anhidrido trifluoroacético [5]. Sin embargo esta ruta aunque más simple tenía el inconveniente de la falta de especificidad en la condensación, pudiendo dar lugar en el caso del UDPG a otros dos pirofosfatos simétricos (fig. 5), y lo que era más grave a compuestos ciclados debido a que uno de los reactivos utilizados, el glucosa-1-fosfato, poseía un hidroxilo vecino en posición adecuada para la formación de un éster cíclico intramolecular (fig. 6).

Es decir que la ventaja de utilizar reactivos con grupos no protegidos, lo que simplificaba bastante la síntesis, estaba contrabalanceada por la inespecificidad de la condensación entre dos compuestos distintos con la consecuencia de obtener a menudo una mezcla compleja del producto deseado y productos secundarios, muy difícil de separar y purificar.

Khorana, que había trabajado en Inglaterra con Todd y lo ha-

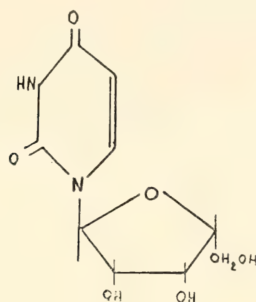


Figura 1

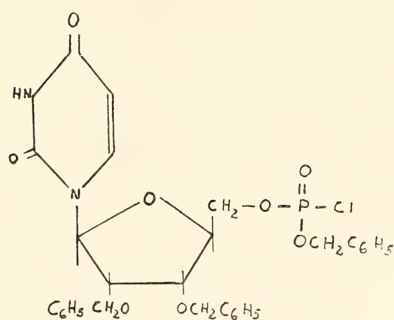


Figura 2

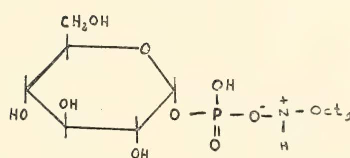


Figura 3

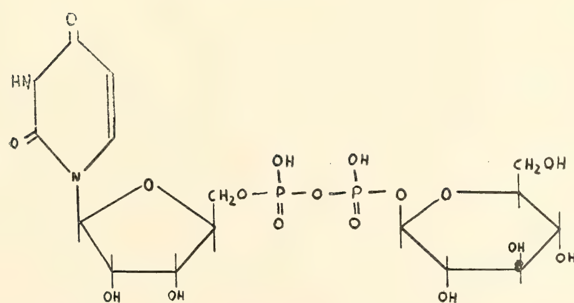
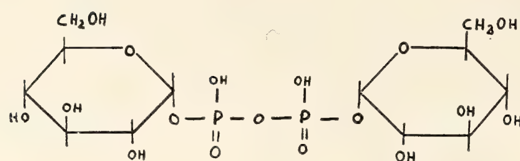
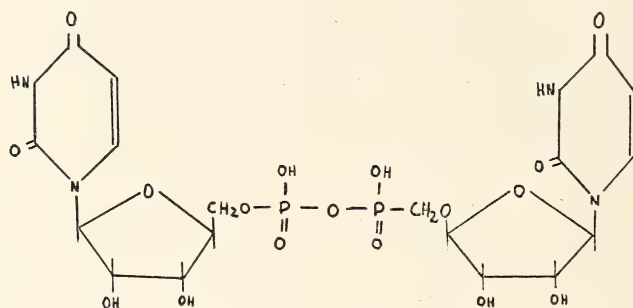


Figura 4



DI GLUCOSA PIROFOSFATO



DI URIDIN PIROFOSFATO

Figura 5

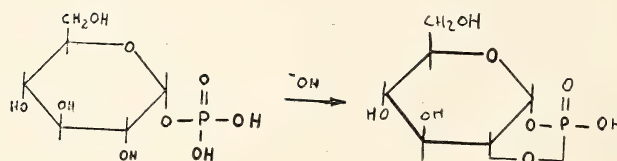


Figura 6

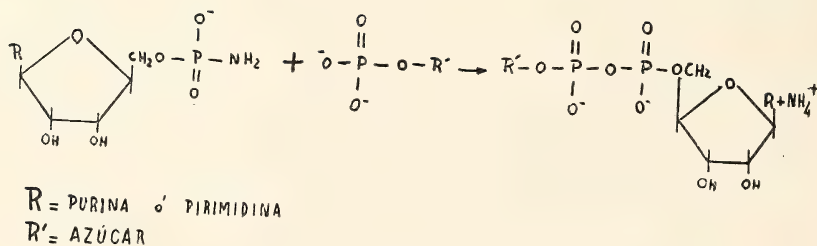


Figura 7

cia entonces independientemente en Canadá, puso a punto un método que conservaba las ventajas del arriba descripto pero sin sus inconvenientes. La idea fue convertir a uno de los dos reactivos (el nucleótido) en un derivado del tipo: $\text{R-O-}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O-}}{\text{P}}}\text{-X}$ que posee una unión P—X muy reactiva, en la que el átomo de fósforo es muy electrofílico y puede dar lugar a la síntesis de una unión pirofosfato por el ataque nucleofílico, en una segunda etapa, del anión adecuado.

Dicho intermediario debería ser lo suficientemente estable para poder ser aislado y conservado adecuadamente, y lo suficientemente reactivo para formar una unión pirofosfato en condiciones relativamente suaves y en ausencia de agentes condensantes

Los fosforoamidados reunían esas cualidades (X :: NH2) ; se conocía bien la reactividad de la unión P→N y ya Lohmann ([6]) muchos años antes había demostrado la capacidad de sistemas biológicos para utilizar fosforoamidatos, como la creatina fosfato, en la síntesis de uniones pirofosfatos. Los nucleósido-fosforoamidatos parecían ser los compuestos ideales para la síntesis de nucleósidos-pirofosfatos no simétricos de interés biológico como el UDPG según la siguiente reacción (fig. 7).

La síntesis de los nucleósido-fosforoamidatos fue resuelta también por Khorana y sus colaboradores ([7]) haciendo reaccionar directamente en un solo paso el nucleótido correspondiente con el NH3 en presencia de un exceso de diciclohexil-carbodiimida como agente condensante, y condiciones apropiadas para la reacción (varias horas de calentamiento a 80° C y una mezcla de formamida, agua y alcohol butílico terciario como solvente). Se obtuvieron rendimientos entre el 85 y el 92 % para el AMP-NH2 y del 70 % al 88 % para el UMP-NH2 ([8]).

Es decir, que si bien Khorana y sus colaboradores (Moffatt y Chambers) habían eliminado la diciclohexil-carbodiimida (DCC) en la etapa final de la síntesis de los nucleótido-azúcares, la utilizaban con éxito en la primera etapa de la misma. Además su uso en exceso permitía que la reacción de síntesis de los fosforoamidatos pudiera realizarse en presencia de una cierta cantidad de agua con lo que nuevamente obviaban los inconvenientes de insolubilidad de los compuestos reaccionantes en solventes orgánicos.

En la segunda etapa y última de la síntesis química del UDPG

*condensaron el UMP-NH_2 con la sal de trioctilamonio del glucosa-*1-fosfato en piridina anhidra. Después de 4 días a temperatura ambiente purificaron el UDPG formado como producto principal por cromatografía en columnas de intercambio iónico, aislándolo como sal de litio con un rendimiento total para la síntesis del 59 % y una pureza del 100 % (9).

Este método publicado en 1958 fue el que se intentó extender en 1960 en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas a la síntesis del UDP-maltosa y otros análogos del UDPG. La preparación de los ésteres fosfóricos necesarios, por los métodos clásicos de la química orgánica no ofreció mayores dificultades. De esa manera se obtuvieron cantidades adecuadas de alfa-glucosa-1-fosfato, beta-glucosa-1-fosfato (otra posibilidad era que el UDPG con la glucosa en configuración beta fuera el mejor sustrato para la síntesis del almidón) y alfa-maltosa-1-fosfato. Sin embargo en la preparación de los fosforoamidatos tropecé con dificultades derivadas fundamentalmente de mi inexperiencia en síntesis en pequeña escala. Recuerdo que le dije a Leloir: "solamente hay 100 miligramos de UMP", y que me contestó: "¿Tanto?, son como 200 micromoles, me basta con que me fabrique 5 micromoles de cada nucleótido-azúcar. Era la primera vez en mi vida que llevaba a la práctica el uso del micromol como parámetro.

Después cuando tuve problemas con el aislamiento del UMP-NH2, pues es bastante difícil de cristalizar, me dijo: "no lo aisle, deme una solución acuosa". Para mi formación de químico orgánico esas palabras sonaban a sacrilegio. La cristalización es el broche de oro de toda síntesis química y una especie de rito para todo químico orgánico que se precie.

Fueron varios meses de ensayos con pocos éxitos y muchos fracasos. Al ver los problemas que tenía, Leloir mostró una de las virtudes que más le admiro: su agudo espíritu crítico y práctico que le hace no aferrarse demasiado a una idea aunque haya surgido de él: "Si no anda el UDP-maltosa" —me dijo— ¿Por qué no fabrica el ADPG?. Puede ser que haya menos problemas partiendo del AMP". Claro que también jugó su papel otra faceta de la personalidad de Leloir que le hace sufrir enormemente ante los gastos excesivos; en efecto, el AMP es mucho más barato que el UMP. Sea por una u otra razón o por ambas, el hecho es que comencé a probar la síntesis del AMP-NH2; todo anduvo mucho más rápido y en poco

tiempo sinteticé el ADPG| Yo ya me había mudado al 2º piso del edificio de la calle Obligado 2490. Pontis me siguió luego en la mudanza y en seguida Cardini, pero al principio era el único ocupante del piso. Grande fue pues mi sorpresa cuando una tarde se apareció Leloir muy excitado a mostrarme los resultados de sus primeros experimentos con el ADPG. Eran realmente espectaculares pues el nucleótido-azúcar de adenina actuaba con una eficiencia 10 veces mayor que el UDPG en la síntesis de almidón ([10]).

De ahí en adelante todo marchó sobre rieles. La utilización de los nucleótido-morfolidatos en lugar de los amidatos ([11, 12]) eliminó los últimos problemas de solubilidad existentes y luego con M. Dankert y S. Passeron pudimos introducir algunas mejoras en la síntesis que aumentaron los rendimientos y la practicidad del método ([13]). Se fabricó toda una serie de análogos del UDPG: el UDP-maltosa, que pasó a ser una curiosidad, pues aparentemente no actúa en ninguna reacción enzimática, el beta-UDPG,CDPG,GDPG, IDPG,dUDPG, dADPG y luego el UDP manosa, ADP manosa, APD-galactosa, UDP-galactosa, GDP-manosa, UDP-xilosa, ADP-fosfoglicérico y ADP-glicérico. Muchos de estos nucleótidos-azúcares se prepararon marcados con C14 en los azúcares, lo que los hizo sumamente útiles para el estudio de reacciones biológicas de transferencia del resto glicosídico.

BIBLIOGRAFIA

1. De Fekete, M. A. R., Leloir, L. F. y Cardini, C. E., Nature, *187*, 918 (1960).
2. Leloir, L. F., De Fekete, M. A. R. y Cardini, C. E., JBC, *235*, 636 (1960).
3. Cardini, C. E., Paladini, A. C., Caputto, R. y Leloir, L. F., Nature, *165*, 191 (1950).
4. Michelson, A. M. y Todd, A. R., J. Chem. Soc., 3469 (1956).
5. Kenner, G. W., Todd, A. R. y Webb, R. F., J. Chem. Soc., 2843 (1954).
6. Lohmann, K., Biochem. Z , *271*, 264 (1934).
7. Chambers, R. W., Moffatt, J. G. y Khorana, H. G., J. A. C. S., *79*, 4240 (1957).
8. Chambers, R. W. y Moffatt, J. G., J. A. C. S., *80*, 3752 (1958).
9. Moffatt, J. G. y Khorana, H. G., J. A. C. S., *80*, 3756 (1958).
10. Recondo, E. F. y Leloir, L. F., Biochem. Biophys. Res. Commun., *12*, 204 (1963).
11. Moffatt, J. G. y Khorana, H. G., J. A. C. S., *83*, 649 (1961).
12. Roseman, S., Distler, J. J., Moffatt, J, G. y Khorana, H. G., J. Am. Chem Soc., *83*, 659 (1961).
13. Recondo, E. F., Dankert, M. y Passeron, S., BBA, *107*, 129 (1965).

NUCLESIDO-DIFOSFATO AZUCARES

Por NELIDA GONZALEZ

Instituto de Investigaciones Bioquímicas « Fundación Campomar »

Aislamiento y distribución

En el metabolismo celular ocupan un lugar preponderante una serie de compuestos que constituyen una familia de análogos en los cuales el átomo de C-hemiacetálico de un azúcar se encuentra ligado a través de una unión éster, al resto fosfórico terminal de un nucleósido 5′ pirofosfato.

El número de miembros de esa familia ha ido aumentando paulatinamente a partir del descubrimiento del uridina difosfato glucosa-UDPG- en 1949, por el grupo de investigadores dirigido por Dr. Luis F. Leloir.

Durante estudios realizados sobre metabolismo de la galactosa ([1], [2]) aislaron de un extracto alcohólico de levadura, un compuesto que se comportaba como cofactor necesario en la transformación de galactosa 1-fosfato en glucosa 1-fosfato. Pero, en realidad, en ese momento, aquel pequeño grupo en el viejo y poco apropiado edificio de la calle Julián Alvarez tenía en sus manos al primer integrante de la familia de los nucleótido-azúcares: el UDP-glucosa, sustancia que llevaría luz sobre uno de los más vastos campos de la bioquímica: metabolismo y síntesis de polisacáridos.

Estructura

La estructura de UDP-glucosa fue deducida originalmente por análisis químicos y enzimáticos ([3]) siendo posteriormente confirmada por síntesis química ([4]).

En una molécula de UDP-glucosa, según datos originales del análisis de la primera muestra de nucleótido ([3]), por cada mol de uridina se determinaron 2,04 moles de fósforo total, de los cuales

1.04 se comportaban como fósforo lábil (15 min a 100° C en ácido 1N), mientras que el poder reductor, calculado como glucosa, después de hidrólisis (10 min a 100° C en ácido 0.01N) era de 1.03 moles.

La unión glucosil-fosfato en el nucleótido azúcar es considerablemente menos estable que en el correspondiente éster fosfórico; de modo que, se obtine una liberación cuantitativa de la glucosa, con formación de UDP y vestigios de UMP, por calentamiento del UDP-glucosa a 100° C durante 15 minutos en ClH 0.01 (3).

En cambio, la hidrólisis total de α-D glucopiranosil 1-fosfato requiere similar tratamiento pero en ácido 1N (5).

Por calentamiento a 100° C durante 30 minutos en ClH 1N, el fosfato lábil del UDP se hidroliza totalmente para dar UMP-5'.

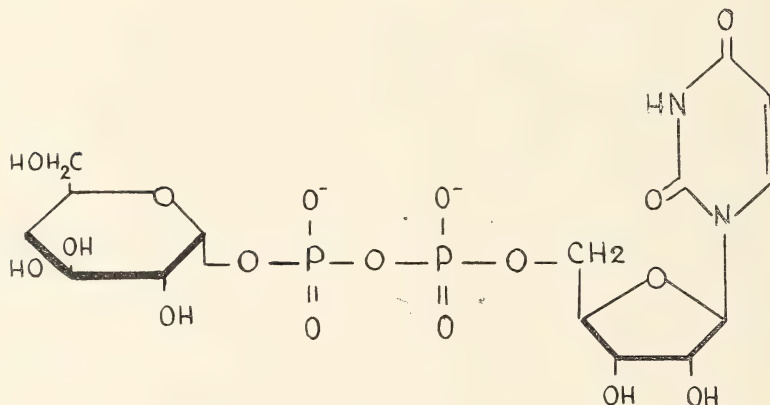


Figura 1

La unión entre el nucleósido y el fosfato es mucho más resistente a la hidrólisis ácida que el resto de las otras uniones. En general, esa unión en los nucleótidos de bases pirimidínicas es mucho más estable que en los correspondientes derivados de bases purínicas.

La unión pirofosfato puede romperse también por acción de enzimas específicas, como la pirofosfatasa orgánica que se encuentra en el veneno de serpiente, y que permite obtener el azúcar fosfato y el nucleótido-monofosfato.

La hidrólisis ácida de algunos nucleótido-azúcares, tales como el UDP-ácido glucurónico y los CDP-pentitoles, puede provocar también la ruptura del puente pirofosfato.

La acción hidrolítica en medio alcalino varía con la naturaleza del residuo azúcar. Cuando existe un OH^- libre en cis- con el OH^-

hemiacetálico, como sucede en la molécula de UDP-glucosa, el compuesto es sensible y la unión pirofosfato se rompe dando UMP-5′ y el azúcar fosfato 1-2 cíclico (fig. 2, *a*).

Por el contrario cuando el OH^- del C-2 no está colocado lo suficientemente cerca del átoma de *P* como para formar el ciclo, o bien cuando está ausente, el compuesto es estable como sucede con los α-D-manopiranosil-nucleótidos (fig. 2 *b*) y los acetil α-D2-hexosamin- o α-D-2 deoxiglicopiranosil-nucleótidos.

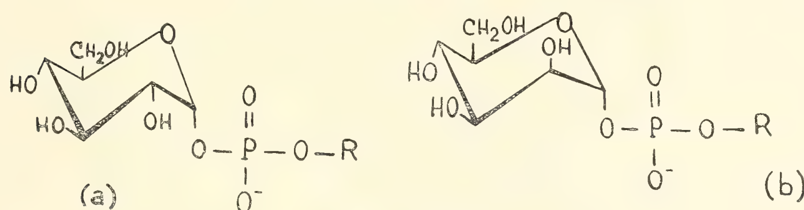


Figura 2

El éster cíclico puede posteriormente hidrolizarse en medio ácido para dar un mezcla de ésteres fosfóricos en el C-1 y C-2 respectivamente.

Aislamiento

El aislamiento de nucleósido-difosfato-azúcares de fuentes naturales comprende generalmente cuatro etapas:

1. Extracción
2. Concentración
3. Fraccionamiento
4 Concentración final.

1) El proceso de extracción comúnmente se efectúa por tratamiento de material previamente molido, con alcohol-50 % a ebullición o bien con ácido tricloro acético o ácido perclórico en frío.

2) La adición de acetato de Hg a pH 4 en alcohol 50 % resultó adecuada para la precipitación de UDP-glucosa ([2]) y de UDP-acetilglucosamina ([6]); mientras que la adición de Ba y etanol se encontró útil para otros nucleótidos como el UDP-glucurónico ([7, 8]).

Sin embargo, y según la impurificación del material que se use, a veces se pueden obviar las etapas anteriores y pasar el extracto directamente a través de una columna de resina de intercambio iónico.

3) El método más conveniente para la etapa da fraccionamiento y separación de los diferentes componentes del extracto, es el que utiliza la distinta afinidad de las diversas sustancias por las resinas de intercambio aniónico. El método fue originalmente desarrollado por Cohn (9) y posteriormente aplicado por Cabib *et al.* (6) al aislamiento de nucleótido-azúcares de levadura. Las resinas se las utiliza comúnmente en forma de ión cloruro (6, 9) o formiato (10), eluyéndoselas con concentraciones crecientes de los correspondientes iones a pH constante (11).

En cuanto al problema de la concentración de los nucleótidos después de la cromatografía en columna, fue resuelto de varias maneras sin ser ninguna de ellas totalmente satisfactoria, particularmente en cuanto a la recuperación cuantitativa del material.

Si el eluyente es el sistema fórmico-formiato de amonio, se los puede eliminar con relativa facilidad por evaporación a sequedad y posterior sublimación al vacío (10).

Cuando se usa Cl_2 Ca, los eluidos pueden ser evaporados a sequedad y extraidos con etanol-éter.

En estas condiciones las sales de Ca de los nucleótidos son insolubles, mientras que el Cl_2 Ca es totalmente soluble (12, 13).

Si se utiliza Cl Na la concentración y desalificación se puede efectuar por absorción sobre carbón activado. En este caso, etanol-amoníaco es un buen eluyente, si bien no es aconsejable para sustancias álcali sensibles. En este caso se puede lavar el carbón con una solución de versene después de la adsorción y luego eluir con etanol 50 % (14).

4) Posteriormente a la concentrración sobre carbón los nucleótidos se pueden purificar por cromatografía sobre papel con solventes adecuados (3).

Distribución

Con posterioridad al descubrimiento de UDP-glucosa, se han aislado otros numerosos nucleótidos-azúcares de diferentes fuentes: microorganismos, animales y plantas. El residuo nucleosídico no es sólo uridina, sino que se han caracterizado derivados de otras bases, como :guanina, citidina, timidina y adenosina.

Entre los nucleótidos hallados existen algunos que no poseen una unión pirofosfato como el citidina 5′ monofosfato-ácido siálico (52) y el CMPP-X (55) cuyo residuo no nucleosídico no ha sido perfectamente determinado aún.

TABLA I

Resto glicosídico	Resto nucleotídico					
	UDP	ADP	CDP	CMP	GDP	TDP
D-glucosa	(2)	(15)	(16)		(17)	(18,19)
2-deoxi D-glucosa	(2a)					
D-galactosa	(20-23)	(24)			(25-25a)	(26,27)
D-fructosa	(28)				(17)	
D- manosa		(24)			(29)	(12)
Glucosamina	(30)					(31)
Galactosamina	(32)					
Acetil glucosamina	(6)	(24)				(31)
Acetil galactosamina	(33)					(31)
Acetil lactosamina	(34)					
D-xilosa	(22)					
L- arabinosa	(22)					
Acido glucurónico	(7)					
Acido galacturónico	(35)					
L-ramnosa	(36) (37)					(38) (12)
Dihidroxiacetona	(39)					
Acetil glucosamina 6-S	(40)					
Acetil glucosamina 6 P-1 glactósido	(41,42)					
Acetil lactosamina ácido siálico	(43)					
N acetil murámicopeptido	(44)					
L-fucosa					(45,46)	
Colitosa					(47)	
D-glicero D-manoheptosa					(48)	
Tivelosa			(49)			
Abecuosa			(49)			
Glicerol			(50)			
Ribitol			(51)			
Acetil neuramínico				(52)		
D-ribosa						(12)
Fosfoglicérico		(53)				
Talometilosa					(54)	

Si bien el resto azúcar en su gran mayoría está constituido por aldosas, se han encontrado también cetosas, oligosacáridos, así como hidratos de carbono sustituidos con iones sulfato, fosfato o pequeños péptidos.

Para muchos de los nucleótidos incluidos en la tabla I, se han encontrado sólo las enzimas que catalizan su conversión a partir de otro nucleótido-azúcar precursor.

Hasta la fecha se han aislado más de cincuenta nucleótidos-azúcares diferentes, comprometidos en interconversiones de azúcares, biosíntesis de oligo y polisacáridos de reserva o componentes de pared celular.

BIBLIOGRAFIA

1. Cardini, C. E., Paladini, A. C., Caputto, R. y Leloir, L. F., Nature, *165*, 191 (1950).

2 *a*. Biely, P. y Bauer, S., Biochem. Biophys. Acta, *121*, 213 (1966).

2. Caputto, R., Leloir, L. F., Cardini, C. E. y Paladini, A. C., J. Biol. Chem., *184*, 333 (1950).

3. Paladini, A. C. y Leloir, L. F., Biochem. J., *51*, 426 (1952).

4. Kenner, G. W., Todd, A. R. y Webb, R. F., J. Chem. Soc., 2843 (1954).

5. Leloir, L. F. y Cardini, C. E., Methods in Enzymol., *3*, 840 (1957).

6. Cabib, E., Leloir, L. F. y Cardini, C. E., J. Biol. Chem., *203*, 1055 (1953).

7. Dutton, G. J. y Storey, I. D. E., Biochem. J., *57*, 275 (1954).

8. Smith, E. E. B. y Mills, G. T., Biochim. et Biophys. Acta, *13*, 587 (1954).

9. Cohn, W. E., J. Chem. Soc., *72*, 1471 (1950).

10. Hulbert, R. B., Schmitz, H., Brumm, A. F. y Potter, V. R., J. Biol. Chem., *209*, 23 (1954).

11. Alm, R. S., Williams, R. J. P. y Tiselius, A., Acta Chem. Scand., *6*, 826 (1952).

12. Baddiley, J. y Blumson, N. L., Biochim. et Biophys. Acta, *39*, 376 (1960).

13. Pontis, H. G. y Blumson, N. L., Biochim. et Biophys. Acta, *27*, 618 (1958).

14. Pontis, H. G., Cabib, E. y Leloir, L. F., Biochim. et Biophys. Acta, *26*, 146 (1957).

15. Recondo, E., Dankert, M. y Leloir, L. F., Biochem. Biophys. Res. Commun., *12*, 204 (1963).

16. Ginsburg, V., O'Brien, P. J. y Hall, C. W., Biochem. Biophys. Res. Commun., *7*, 1 (1962).

17. Pontis, H. G., James, A. L. y Baddiley, J., Biochem. J., *75*, 428 (1960).

18. Kornfel, S. y Glaser, L., J. Biol. Chem., *236*, 1791 (1961).

19. Pazur, J. H. y Shuey, E. W., J. Biol. Chem., *236*, 1780 (1961).

20. Leloir, L. F., Arch. Biochem. Biophys., *33*, 186 (1951).

21. Ballio, A., Casinovi, C. y Serluppi-Crescenzi, G., Biochem. Biophys. Acta, *20*, 414 (1956).

22. Ginsburg, V., Stumpf, P. K. y Hassid, W. Z., J. Biol. Chem., *223*, 977 (1956).

23. Hansen, R. G., Freedland, R. A. y Scott, H. M., J. Biol. Chem., *219*, 391 (1956).

24. Dankert, M., Passeron, S., Recondo, E. y Leloir, L. F., Biochem. Biophys. Res. Commun., *14*, 358 (1964).

25. Su, J. C. y Hassid, W. Z., Biochemistry, *1*, 474 (1962).

25 *a*. Sanwal, G. G. y Preiss, J., Phytochem., *8*, 707 (1969).

26. Pazur, J. H., Kleppe, K. y Cepure, A., Biochem. Biophys. Res. Commun., *7*, 157 (1962).

27. Neufeld, E. F., Biochem. Biophys. Res. Commun., *7*, 461 (1962).
28. González, N. S. y Pontis, H. G., Biochem. et Biophys. Acta, *69*, 179 (1963).
29. Cabib, E. y Leloir, L. F., J. Biol. Chem., *206*, 779 (1954).
30. Maley, F., Maley, G. F. y Lardy, H. A., J. Am. Chem. Soc., *78*, 5303 (1956).
31. Kornfeld, S. y Glaser, L., Biochem. Biophys. Acta, *56*, 184 (1962); J. Biol. Chem., *237*, 3052 (1962).
32. Maley, F. y Maley, G. F., Biochim. Biophys. Acta, *31*, 577 (1959).
33. Pontis, H. G., J. Biol. Chem., *216*, 195 (1955).
34. Kobata, A., Biochem. Biophys. Res. Commun., *7*, 346 (1962).
35. Smith, E. E. B , Mills, G. T. y Harper, E. M., Biochem. Biophys. Acta, *23*, 662 (1957).
36. Smith, E. E. B., Galloway, B. y Mills, G. T., Biochem. Biophys. Acta, *33*, 276 (1959).
37. Vozari Hampe, M. M. y González, N. S., Biochem. Biophys. Acta, *148*, 566 (1968).
38. Strominger, J. L. y Scott, S. S., Biochem. Biophya. Acta, *35*, 552 (1959).
39. Smith, E. E. B., Galloway, B. y Mills, G. T., Biochem. Biophys. Res. Commun., *5*, 148 (1961).
40. Strominger, J. L., Biochem. Biophys. Acta, *17*, 283 (1955) ; J. Biol. Chem., *237*, 1388 (1962).
41. Suzuki, S., J. Biol. Chem., *237*, 1393 (1962).
42. Gabriel, O. y Askwell, G., J. Biol. Chem., *237*, 1400 (1962).
43. Jourdian, G. W., Shimizu, F. y Roseman, S., Federation Proc., *20*, 161 (1961).
44. Park, J. T., J. Biol. Chem., *194*, 877, 885 y 897 (1952).
45. Ginsburg, V. y Kirkman, H. N., J. Am. Chem. Soc., *80*, 3481 (1958).
46. Denamur, R., Fauconneau, G. y Guntz, G., Compt. Rend., *246*, 2820 (1958)
47. Heath, E. C., Biochem. Biophys. Acta, *39*, 377 (1960).
48. Ginsburg, V., O'Brien, P. J. y Hall, C. W., J. Biol. Chem., *237*, 497 (1962).
49. Nikaido, A. y Jokura, K., Biochem. Biophys. Res. Commun., *6*, 304 (1961).
50. Baddiley, J., Buchanan, J. G., Mathias, A. P. y Sanderson, A. R., J. Chem. Soc., 4583 (1956).
51. Baddiley, J., Buchanan, J. G., Carss, B. y Mathias, A. P., J. Chem. Soc., 4583 (1956).
52. Comb, D. G., Shimizu, F. y Roseman, S., J. Amer. Chem. Soc., *81*, 5513 (1959).
53. Hashimoto, T., J. Biochem. (Tokyo), *50*, 337 (1961).
54. Markovitz, A., Biochem. Biophys. Res. Commun., *6*, 250 (1961).
55. Elnaghy, M. A. y Nordin, P., Biochim. Biophys. Res. Commun., *18*, 501 (1965).

BIOSINTESIS E INTERCONVERSION DE NUCLEOSIDO-DIFOSTATO-AZUCARES

Por SUSANA PASSERON y HECTOR CARMINATTI

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, « Fundación Campomar »

RESUMEN

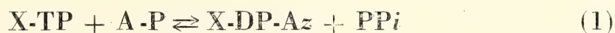
Se describen las funciones de los nucleósido-difosfato-azúcares en el metabolismo de los Hidratos de Carbono. Se enumeran los sistemas enzimáticos responsables de su biosíntesis a partir del nucleósido-trifosfato y del azúcar-fosfato correspondiente.

En los casos conocidos se detallan los mecanismos de interconversión del azúcar unido al resto nucleotídico.

BIOSINTESIS

Es bien conocido el rol de los nucleótido-azúcares, como intermediarios claves en el metabolismo de los hidratos de carbono. Desempeñan un papel fundamental en dos campos: en la interconversión de azúcares y en la formación de uniones glucosídicas. Parece ser que la porción nucleotídica de estos compuestos actúa como activador del azúcar y como sostén adecuado para la enzima, de tal manera que ésta fija el azúcar en el espacio, en la posición más favorable para su transformación o transferencia.

En la naturaleza la síntesis de los nucleótidos-azúcares, se realiza de acuerdo a la siguiente reacción general:



$$\text{X-TP} + \text{A-P} \rightleftharpoons \text{X-DP-Az} + \text{PP}i \qquad (1)$$

donde X es un nucleósido formado por una base purínica (adenina o guanina) o pirimidínica (uracilo, timina o citosina) unida a la ribosa o a la 2-deoxiribosa; Az puede ser cualquier azúcar o compuesto relacionado.

La reacción (1) está catalizada por enzimas, que se encuentran en todos los organismos, cuyo nombre trivial es nucleótido-azúcar

pirofosforilasa. Estas enzimas requieren para actuar un catión divalente; el Mg^{++} es generalmente el más eficiente aunque también actúan Mn^{++}, Co^{++} y Ca^{++}.

La primera enzima de este grupo fue descubierta en extractos de levadura por Munch Petersen y colaboradores en 1953 ([1]), cataliza la síntesis de UDPG de acuerdo a la reacción (1) donde X es uridina y Az es glucosa.

Esta enzima ha sido detectada en diferentes tipos de células. El grupo de Hansen ha cristalizado la enzima de hígado de ternera ([2]).

La constante de equilibrio para esta reacción en el sentido de la formación de UDPG es 0,28 - 0,34 y el peso molecular de esta enzima es de aproximadamente 350.000 daltones.

Una cepa mutante de la bacteria *Escherichia coli*, que carece de esta enzima tiene una cantidad sumamente baja de UDPG; lo cual es un indicio de que esta reacción (1) es la principal, sino la única vía de formación de este compuesto. La carencia de este nucleótido-azúcar trae aparejado una serie de cambios en la composición de la pared celular de la bacteria.

Aunque las reacciones catalizadas por las pirofosforilasas (ecuación (1)) son reversibles, dentro de la célula la presencia de enzimas que destruyen el pirofosfato inorgánico hace que *in vivo* la reacción (1) funcione preferentemente en dirección de la síntesis del nucleótido-azúcar.

Hoy se conocen más de sesenta nucleótido-azúcares, la mayoría de los cuales tienen una función conocida en el metabolismo celular. Es evidente, entonces, la importancia de las enzimas que específicamente catalizan su formación. Una recopilación de las principales pirosfoforilasas se encuentra en la sección tercera del volumen VIII del "Methods in Enzymology".

Interconversión de azúcares.

En esta sección nos vamos a referir a una de las dos principales funciones de los nucleótido-azúcares, es decir a la transformación de su resto monosacárido.

Epimerización en el carbono 4 del azúcar

Leloir y colaboradores ([3]) fueron los primeros que encontraron en las levaduras crecidas en galactosa, una enzima (UDPG-4 epimerasa) que cataliza la siguiente reacción.



(2) $$UDPG \rightleftharpoons UDP\text{-}Gal$$

El equilibrio se alcanza cuando la mezcla de reacción contiene 25 % de UDP-Gal. El cambio consiste en la inversión de la configuración del carbono 4 de la hexosa. Como se puede visualizar en el esquema, en la conformación más estable de la glucosa, es decir la C1 el resultado de la reacción, es tal que el hidroxilo que en la glucosa era ecuatorial queda axial en la galactosa.

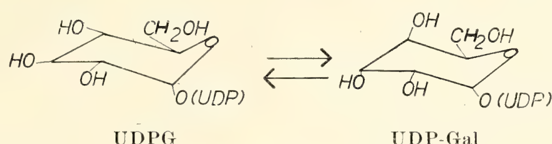


Figura 1

El mecanismo de esta reacción has ido objeto de muchos estudios (4).

Un importante hallazgo realizado por Maxwell (5) fue que la reacción requiere cantidades catalíticas de NAD^+. Por consiguiente es razonable suponer que la hexosa es oxidada por el NAD^+ a un intermediario cetónico, el cual a su vez sería reducido por el NADH formado. Este se encontraría fuertemente unido a la enzima, no intercambiándose con el NADH agregado a la mezcla de reacción.

En apoyo de esta hipótesis están las siguientes evidencias experimentales:

a) si la reacción se lleva a cabo en agua tritiada no hay incorporación de H^3 a la molécula de hexosa;

b) si se marca el UDPG con H^3 en la posición 4 de la glucosa, no hay pérdida de marca cuando se transforma en UDP-Gal;

c) si se agrega a la mezcla de reacción NADH marcado con D^2, éste no se incorpora a la hexosa;

d) siguiendo el estado de óxido-reducción del NAD^+ por métodos fluorométricos se encuentra que éste, en un estado intermediario transitorio unido a la enzima, está reducido.

Se han descripto en distintos organismos muchas otras nucleótido-azúcar-4-epimerasas. En la tabla I se ha recopilado una lista de las principales:

TABLA I

	Azúcares interconvertidos	Fuente	Referencia
UDP	D-glucosa ⇄ D-galactosa	levadura, hígado	(3) (6)
UDP	Acido D-glucurónico ⇄ Acido D-galacturónico	plantas, bacterias	(7) (8)
UDP	D-xilosa ⇄ L-arabinosa	plantas	(9)
UDP	D-glucosamina ⇄ D-galactosamina	hígado	(10)
UDP	D-Ac. glucosamina ⇄ D-Ac. galactosamina	animales, hongos bacterias	(11-13)
TDP	D-Ac. glucosamina ⇄ D-Ac. galactosamina	bacterias	(14)

Epimerización en el carbono 2 del azúcar

En 1962 Roseman (15) encontró en hígado una enzima que cataliza la siguiente reacción:



(3) UDP-N- Ac. glucosamina $\xrightarrow{Mg^{++}}$ N-Ac. manosamina + UDP

La conversión requiere la inversión de la configuración del carbono 2 del amino azúcar.

No se conoce el mecanismo de esta reacción, ni tampoco si el UDP-N- Acetil manosamina es un intermediario. En esta conversión el grupo acetamido que es ecuatorial en la conformación más estable de la N-Acetil-glucosamina pasa a ser axial en la N-Acetil-manosamina:

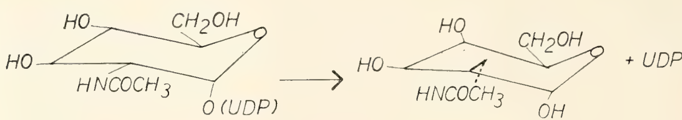
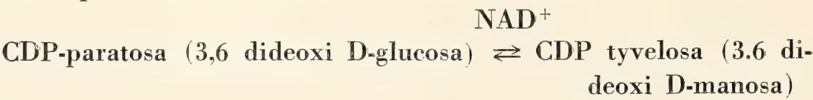


Figura 2

Otra epimerización en el carbono 2 del azúcar fue encontrada por el grupo de Strominger (16) en una cepa de bacteria (Pasteurella pseudotuberculosis):



$$\xrightleftharpoons{NAD^+}$$

CDP-paratosa (3,6 dideoxi D-glucosa) ⇄ CDP tyvelosa (3.6 dideoxi D-manosa)

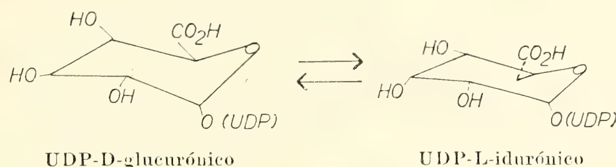
Esos azúcares raros son constituyentes característicos de la pared celular de determinadas bacterias.

Epimerización en el carbono 5 del azúcar

Otro interesante caso de interconversión es el siguiente:


(4) UDP-D-glucurónico $\rightleftarrows$ UDP-L-idurónico

Jacobson y Davidson (17) detectaron una enzima en piel de conejo que cataliza dicha reacción. El proceso requiere NAD^+ y como en el caso de las epimerizaciones en el carbono 4, no hay incorporación de tritio cuando la reacción se lleva a cabo en agua tritiada. Un mecanismo posible postulado para esta reacción es el que involucra la formación de un grupo cetónico en el carbono 4 seguida de la formación de un doble enlace entre los carbanos 4 y 5.

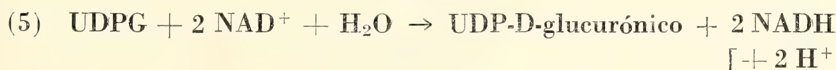


UDP-D-glucurónico UDP-L-idurónico

Figura 3

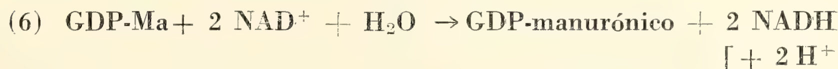
Oxidación

Una importante transformación de los nucleótido-azúcares es la oxidación del carbono 6 del resto hexosa. El primer caso estudiado fue el de la oxidación de UDPG, catalizada por una enzima de hígado (18), de acuerdo a la siguiente reacción:


(5) UDPG + 2 NAD^+ + H_2O $\rightarrow$ UDP-D-glucurónico + 2 NADH [+ 2 H^+

Posteriormente se encontró que esta transformación también ocurre en vegetales (19). En cuanto a su mecanismo, se esperaría que la oxidación de un alcohol primario a un grupo carboxilo ocurriera a través de un intermediario aldehídico; sin embargo hasta el momento no se ha podido detectar un compuesto de esa naturaleza.

En bacterias, tales como Arthrobacter (20), ocurre una transformación formalmente similar:


(6) GDP-Ma + 2 NAD^+ + H_2O $\rightarrow$ GDP-manurónico + 2 NADH [+ 2 H^+

Es de notar que en una variedad de esta bacteria, un polímero de ácido manurónico forma parte de un heteropolisacárido extracelular.

Decarboxilación

Ankel y Feingold ([21]) detectaron en plantas una enzima que cataliza la siguiente reacción:



(7) UDP-glucurónico → UDP-D-xilosa + CO_2

La enzima de germen de trigo ha sido muy purificada, así como también la extraída de una bacteria, *Cryptococcus laurentii.* Esta última requiere en forma absoluta la presencia de NAD^+ para su actividad.

La UDP-glucurónico descarboxilasa se encuentra muy distribuida en plantas ([19]).

Deoxihexosas

Estos compuestos se encuentran en tejidos animales, plantas y bacterias, formando parte de polisacáridos, lipopolisacáridos y glucoproteínas.

Los más comunes son: la L-ramnosa y la L-fucosa. Esta última se encuentra en tejidos animales, en los determinantes antigénicos de los glóbulos rojos y en los oligosacáridos de la leche y demás fluidos corporales. También está presente en plantas y bacterias.

La L-ramosa forma parte de los polisacáridos bacterianos, glucósidos de plantas y tal vez esté presente en tejidos animales.

En bacterias se han encontrado también otras deoxihexosas, con grupos amino en posición 2 ó 4, y algunas dideoxihexosas.

Biosíntesis

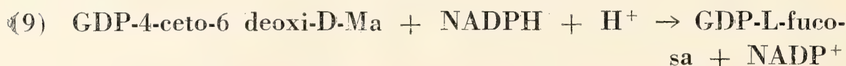
La formación de las deoxihexosas es un proceso bastante más complicado que cualquiera de los mencionados anteriormente.

Se han aislado muchos sistemas enzimáticos, principalmente de microorganismos, que llevan a cabo dicha transformación. Todos ellos tienen de común la formación de un 4-ceto-intermediario.

Por ejemplo, la formación de L-fucosa ocurre de la siguiente manera:



(8) GDP-D-Ma $\xrightarrow{NAD^+}$ GDP-4-ceto-6 deoxi-D-Ma + H_2O

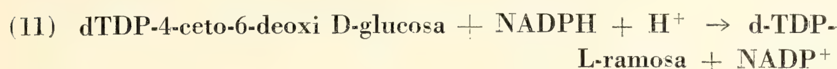


(9) GDP-4-ceto-6 deoxi-D-Ma + NADPH + H^+ → GDP-L-fucosa + $NADP^+$

De una manera muy similar la L-ramosa se forma según la siguiente serie de reacciones:

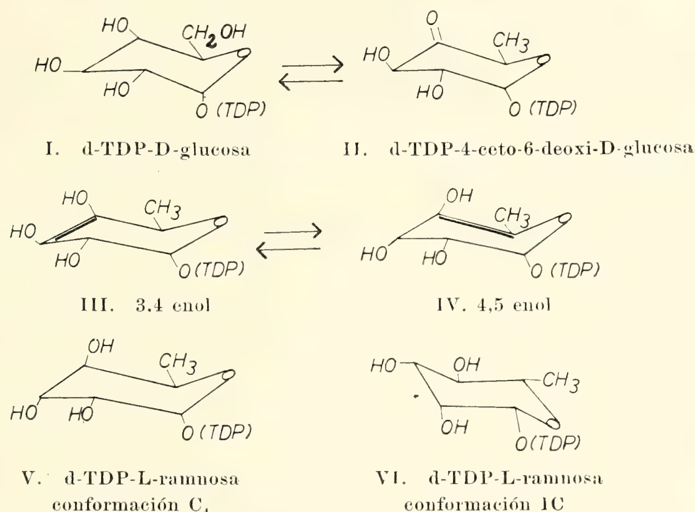


(10) dTDP-D-glucosa $\xrightarrow{NAD^+}$ d-TDP-4 ceto-6-deoxi-D-glucosa + H_2O



(11) dTDP-4-ceto-6-deoxi D-glucosa + NADPH + H^+ → d-TDP-L-ramosa + $NADP^+$

Esta secuencia de reacciones se puede esquematizar de la siguiente manera:



I. d-TDP-D-glucosa

II. d-TDP-4-ceto-6-deoxi-D-glucosa

III. 3.4 enol

IV. 4,5 enol

V. d-TDP-L-ramnosa conformación C_1

VI. d-TDP-L-ramnosa conformación 1C

Figura 4

La primera etapa consiste en la formación de un 4-ceto compuesto (II). Esta etapa es formalmente una óxido reducción interna, es decir la oxidación del carbono 4 y reducción del carbono 6. Sin embargo este proceso requiere NAD^+, el cual probablemente actúa oxidando el carbono 4 y el NADH producido reduce el carbono 6 dando el dTDP-4-ceto-6-deoxi-D-glucosa.

Las inversiones de configuración que tienen lugar en los carbonos 3 y 5 probablemente ocurran a través de intermediarios enedioles (III y IV). Pod último, el grupo ceto de la posición 4 (II) en equilibrio con las formas enólicas (III y IV) se reduciría con NADPH y de esta forma se llega al dTDP-L-ramnosa.

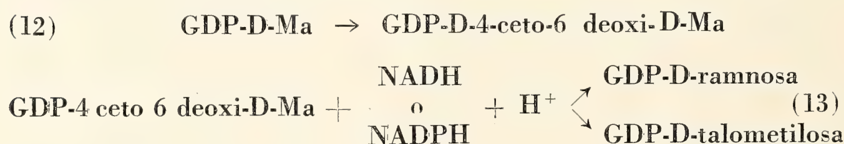
Es interesante observar que la L-ramnosa tal cual se la ve en (V) posee una conformación con dos grupos hidroxilos y un metilo axia-

les, siendo ésta una conformación inestable. Por lo tanto es razonable pensar que en alguna etapa de la reacción la ramnosa adquiere la conformación que se ve en (VI). Este mecanismo se ve apoyado por numerosos datos experimentales ([22]).

En plantas, la formación de L- ramnosa se produce específicamente a partir de UDPG ([23]), a diferencia de lo que ocurre en bacterias donde el d-TDPG es el precursor.

La reacción que conduce a GDP-L-fucosa a partir de GDP-D-Ma, es formalmente muy similar a la que se acaba de describir para la formación de d-TDP-L- ramnosa. Se han aislado sistemas enzimáticos de *Aerobacter aerogenes* ([24]), pulmón de conejo y otros tejidos animales ([25]), que llevan a cabo dicha transformación. El proceso requiere NAD^+ y NADPH. En este caso se ha visto que el intermediario cetónico reacciona con o-fenilendiamina; además si se lo reduce con hidrógeno y un catalizador de rhodio, se obtienen dos azúcares: 6-deoxi-talosa y 6-deoxi-manosa. Pruebas todas estas de la existencia del 4-ceto-6-deoxi-D-manosa como intermedio en esta transformación. Recientemente Liao y Barber han encontrado también evidencias de la existencia de este intermediario en la síntesis de GDP-L-fucosa en *Phaseolus vulgaris* ([26]).

En 1962 Markovitz y colaboradores ([27]), en una basteria no clasificada, aislada del suelo, encontraron un sistema enzimático que cataliza las siguientes reacciones:

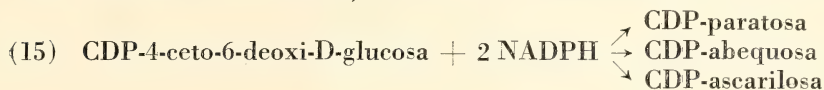


Como se deduce de los ecuación (13) esta reducción no es estereoespecífica, obteniéndose los dos posibles epímeros.

3,6 dideoxihexosas

Estos compuestos se encuentran formando parte de los lipopolisacáridos bacterianos. Se han encontrado numerosos nucleótido-azúcares que contienen 3,6-dideoxihexosas en varias cepas bacterianas ([22, 28]). Por ejemplo: GDP-colitosa (3,6 dideoxi L-galactosa), CDP-abequosa (3,6 dideoxi-D galactosa), CDP-tivelosa (3,6 dideoxi-D-manosa), CDP-paratosa (3,6 dideoxi-D-glucosa) y CDP-ascarilosa (3.6 dideoxi L-manosa). La formación de estos compuestos se ejemplifica en la siguiente serie de reacciones:


(14) CDP-D-glucosa $\xrightarrow{NAD^+}$ CDP-4-ceto-6-deoxi-D-glucosa + H_2O


(15) CDP-4-ceto-6-deoxi-D-glucosa + 2 NADPH → CDP-paratosa / CDP-abequosa / CDP-ascarilosa

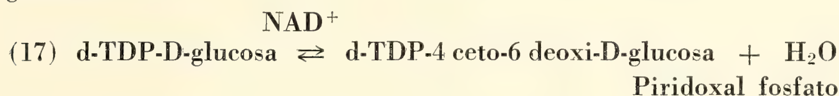

(16) CDP-paratosa $\overset{NAD^+}{\rightleftarrows}$ CDP-tivelosa

Estos procesos han sido bien estudiados con sistemas enzimáticos aislados por Strominger y colaboradores (28) de algunas cepas de *Pasteurella* y *Salmonella.*

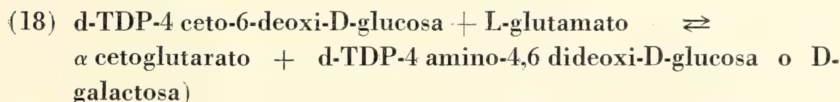
La reacción (14) es muy similar a la descripta para la formación de 6 deoxihexosas. Las siguientes reacciones involucran la reducción de los carbonos 3 y 4, y la epimerización de los carbonos 4 y 5. El mecanismo de estas transformaciones es complicado y parece que se requiere otro cofactor aparte de los piridin-nucleótidos (29).

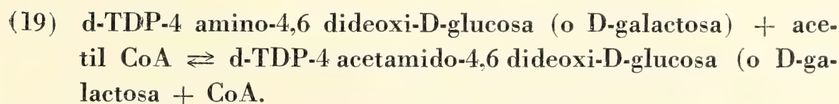
Amino Deoxi-azúcares

Una ejemplo de la biosíntesis de aminodeoxiazúcares es el siguiente:


(17) d-TDP-D-glucosa $\overset{NAD^+}{\rightleftarrows}$ d-TDP-4 ceto-6 deoxi-D-glucosa + H_2O

Piridoxal fosfato


(18) d-TDP-4 ceto-6-deoxi-D-glucosa + L-glutamato ⇄ α cetoglutarato + d-TDP-4 amino-4,6 dideoxi-D-glucosa o D-galactosa)


(19) d-TDP-4 amino-4,6 dideoxi-D-glucosa (o D-galactosa) + acetil CoA ⇄ d-TDP-4 acetamido-4,6 dideoxi-D-glucosa (o D-galactosa + CoA.

Esta secuencia de reacciones ha sido estudiada por Strominger y colaboradores (30) con sistemas enzimáticos aislados de la bacteria *Escherichia coli.*

El producto formado en la reacción (17) es también un intermediario en la síntesis de dTDP-L-ramnosa. La reacción (18) es una transaminación estereoespecífica; en algunas cepas de bacterias se obtiene el derivado de la galactosa, en otras el derivado de la glucosa.

La reacción final (19) es una acetilación del grupo amino del azúcar y está catalizada por transacetilasas específicas. En esta etapa no hay cambio de la configuración de los azúcares.

BIBLIOGRAFIA

1. Munch-Petersen, A., Kalckar, H. M., Cutolo, E. y Smith, E. E. B., Nature, *172*, 1036 (1953).
2. Albrecht, G. J., Bass, S. T., Seifert, L. L. y Hansen, R. G., J. Biol. Chem., *241*, 2968 (1966).
3. Leloir, L. F., Arch. Biochem. Biophys., *38*, 186 (1951).
4. Kalckar, H. M., Adv. Enzymol., *20*, 111 (1958).
5. Maxwell, E. S., J. Am. Chem. Soc., *78*, 1074 (1956).
6. — J. Biol. Chem., *229*, 139 (1957).
7. Neufeld, E. F., Feingold, D. S. y Hassid, W. Z., J. Biol. Chem., *223*, 783 (1958).
8. Smith, E. E. B., Mills, G. T., Bernheimer, H. P. y Austrian, R., Biochem. Biophys. Acta, *29*, 640 (1958).
9. Ginsburg, V., Neufeld, E. F. y Hassid, W. Z., Proc. Nat. Ac. Sci., *42*, 333 (1953).
10. Maley, F. y Maley, G. F., Biochim. Biophys. Acta, *31*, 577 (1959).
11. Jacobson, B. y Davidson, E. A., Biochem. Biophys. Acta, *73*, 145 (1963).
12. Cardini, C. E. y Leloir, L. F., J. Biol. Chem., *225*, 317 (1957).
13. Glaser, L., Biochem. Biophys. Acta, *31*, 575 (1959).
14. Kornfeld, S. y Glaser, L., J. Biol. Chem., *237*, 3052 (1962).
15. Roseman, S., Fed. Proc., *21*, 1075 (1962).
16. Matsuhashi, S. y Strominger, J. L., Biochem. Biophys. Res. Comm., *20*, 169 (1965).
17. Jacobson, B. y Davidson, E. A., J. Biol. Chem., *237*, 638 (1962).
18. Strominger, J. L., Kalckar, H. M., Axelrod, J. y Maxwell, E. S., J. Am. Chem. Soc., *76*, 6411 (1954).
19. Hassid, W. Z., Science, *165*, 137 (1969).
20. Preiss, J., J. Biol. Chem., *239*, 3127 (1964).
21. Ankel, H. y Feingold, D. S., Biochemistry, *4*, 2468 (1965).
22. Glaser, L., Physiological Rev., *43*, 215 (1963).
23. Barber, G. A., Arch. Biochem. Biophys., *103*, 276 (1963).
24. Ginsburg, V., J. Biol. Chem., *235*, 2196 (1960).
25. Foster, D. W. y Ginsburg, V., Biochem. Biophys. Acta, *54*, 376 (1961).
26. Liao, T. H. y Barber, G. A., Biochem. Biophys. Acta, *230*, 64 (1971).
27. Marcovitz, A. y Sylvan, S., J. of Bact., *83*, 483 (1962).
28. Matsuhashi, S. y Strominger, J. L., Meth. in Enz., VIII, 310 (1966).
29. Matsuhashi, S., Matsuhashi, M. y Strominger, J. L., J. Biol. Chem., *241*, 4267 (1966).
30. Matsuhashi, M. y Strominger, J. L., J. Biol. Chem., *239*, 2454 (1964).

BIOSINTESIS DE GLUCOSIDOS

POR CARLOS E. CARDINI
Instituto de Investigaciones Bioquímicas, « Fundación Campomar »
y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

RESUMEN

Se describen los resultados actuales sobre el rol y mecanismo de biosíntesis de los fenol-glucósidos en las plantas y en los insectos.

Existen extensamente distribuidos en la naturaleza una gran cantidad de compuestos de estructura muy diversa, pero que tienen en común el estar combinados sea a la glucosa o a otros mono- o oligosacáridos, en forma glucosídica. La variedad mayor se encuentra en las plantas, en donde su función es bastante oscura. Un hecho, ya demostrado por Ciamician y Ravenna en el año 1916, fue que la inoculación de ciertos fenoles en algunas plantas, originaba la aparición en los tejidos de los correspondientes glusósidos. Esto lleva a pensar que en algunos casos, su función es de carácter defensivo transformando compuestos tóxicos en sustancias inocuas, proceso análogo al que existe en los animales en al glucuronación hepática. Estos compuestos tóxicos se originarían normalmente en el metabolismo y se mantendrían al estado de glucósidos hasta el momento de su utilización, concentrados en las vacuolas de las células. Compuestos de este tipo han sido señalados como responsables de interacciones químicas entre especies vegetales (1), y como defensa contra ataques de otras especies como hongos, insectos y otros depredadores. Existe también evidencia de que en algunas cadenas metabólicas, la glucosidación es una etapa intermedia importante.

Los glucósidos más sencillos en plantas hasta ahora aislados son el β-etil-fructofuranósido (2) y el β-etil-glucopiranósido (3). Compuestos muy extendidos son los glucósidos fenólicos tales como la

arbutina y la salicina. El máximo de complejidad se encuentra en los derivados de politerpenos y esteroides.

La primera evidencia de cuál es el mecanismo de glucosidación de los fenoles, se obtuvo con extractos de germen de trigo, en donde se halló un sistema enzimático que transfiere la glucosa del UDP-glucosa a la hidroquinona, origiando la arbutina ([4]). El aceptor más activo era la hidroquinona, siguiendo la hidroxi-hidroquinona y la metoxi-hidroquinona. El fenol y los aminofenoles son inactivos ([5-6]). En el mismo extracto se logró purificar otro sistema enzimático que adiciona otro resto glusosídico y partiendo de la arbutina se origina la genciobiosil-hidroquinona ([7]), siendo en este caso los mejores aceptores del fenol-glucósido y la salicina. Un tercer resto de glucosa puede también adicionarse originando un trisacárido-glucósido, el genciotriosil-hidroquinona ([8]).

Trabajos posteriores demostraron que este mecanismo de formación de glucósidos es universal y que también actúan como dadores otros nucleótidos-azúcares como el ADP-glucosa ([3]) y el TDP-glucosa ([10]). No solamente actúan fenoles como aceptores, sino también esteroles ([11-12]) y ciclitoles, como el inositol ([13]).

Dada la gran capacidad de glucosidación del gérmen de trigo, se estudió la posible existencia de glucósidos en el mismo. Se demostró así la existencia del glucósido, genciobiosido y genciotriosido de la metoxihidroquinona ([14]). La especial estructura de estos glucósidos fenólicos, con una función fenol libre en posición para respecto a la unión glucósídica, hace que liberen su cadena glucosídica intacta por acción de oxidantes suaves como el agua de bromo o por la polifenoloxidasa vegetal ([15-16]).

Un mecanismo similar de glucosidación fue demostrado por Trivelloni ([17]) en los insectos. Trabajando con cuerpo graso de la langosta, logró separar dos fracciones, posiblemente dos enzimas distintas, una muy activa para la hidroquinona y otra para el o.nitrofenol ([18]). Además demostró en el cuerpo graso la presencia de un glucósido muy similar a la arbutina.

En el caso de los insectos la glucosidación juega sin duda un rol defensivo, de sustancias tóxicas ingeridas, como en el caso de insecticidas, o producidas en el metabolismo. Además en un caso ha sido demostrado su rol de mantener en reserva fenoles al estado inactivo. Así en la formación de la cutícula en algunos insectos en el momento requerido se liberan fenoles de los glucósidos correspondien-

tes. Estos fenoles se polimerizan por acción de una oxidasa y actúan como curtientes de la proteína que forma la cutícula elástica e impermeable que forma el exoesqueleto o la bolsa de almacenamiento de los huevos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Whittaker, R. H. y Feeny, P. P., *Allelochemics: Chemical Interactions between Species*, Science, *171*, 757 (1971).
2. Moreno, A. y Cardini, C. E., Arch. Bioch. and Bioph., *108*, 361 (1964).
3. Liu, T. Y., Oppenhein, A. y Castelfranco, P., Plant Physiol., *40*, 1261 (1965).
4. Cardini, C. E. y Leloir, L. F., Ciencia e Investigación, *13*, 514 (1965).
5. Cardini, C. E. y Yamaha, T., Nature, *182*, 1446 (1958).
6. Yamaha, T. y Cardini, C. E., Arch. Bioch. and Bioph., *86*, 127 (1960).
7. — Arch. Bioch. and Bioph., *86*, 133 (1960).
8. Conchie, J., Moreno, A. y Cardini, C. E., Arch. Bioch. Bioph., *94*, 342 (1961).
9. Trivelloni, J. C., Recondo, E. y Cardini, C. E., Nature, *195*, 1202 (1962).
10. Gonçalves, R. J., Enzymologia, *26*, 287 (1963).
11. Lavintman, N. y Cardini, C. E., Bioch. Bioph. Acta, *201*, 508 (1970).
12. — An. Asoc. Quím. Arg. (en prensa).
13. Frydman, R. B. y Neufeld, E. F., Bioch. Biophys. Res. Comm., *12*, 121 (1963)
14. Moreno, A., *Glucósidos del germen del trigo*, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA (1963).
15. Cardini, C. E., Ciencia e Investigación, *17*, 349 (1961).
16. Moreno, A. y Cardini, C. E., An. Asoc. Quím. Arg., *53*, 269 (1965).
17. Trivelloni, J. C., Arch. Bioch. Biophys., *89*, 149 (1960).
18. — Enzymologia, *26*, 329 (1964).

METABOLISMO DE LA SACAROSA

Por CARLOS E CARDINI

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, « Fundación Campomar »
y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

RESUMEN

Se describen en forma crítica los resultados actuales sobre el metabolismo de la sacarosa. En primer lugar se estudia el mecanismo de activación de la glucosa a través de la formación de los diversos nucleótidos-azúcares y se comparan las características de cada uno de ellos en relación con la formación de la sacarosa. La importancia de la reacción de formación de la sacarosa-fosfato y la reversibilidad de la reacción tanto para la biosíntesis de la sacarosa y de su fosfato, se estudian especialmente en el proceso de transformación reversible entre la sacarosa y el almidón, proceso esencial en el metabolismo de los hidratos de carbono en las plantas.

El disacárido sacarosa juega un rol único en el reino vegetal y con la posible excepción de la glucosa y del almidón, constituye desde el punto de vista metabólico, el más importante azúcar en las plantas.

Se encuentra en su mayor parte al estado libre, tanto dentro de la célula como en los medios intercelulares, llegando a tener concentraciones muy altas en la savia (hasta el 20 %) y en los tejidos que la acumulan como reserva. Una fracción muy pequeña, pero metabólicamente muy activa, está en forma de sacarosa-6′ - fosfato, con un fosfato en el resto fructosilo. Otra fracción bastante importante en algunos vegetales, se encuentra en forma de oligosacáridos de bajo peso molecular unida a uno o más restos galatosilos (rafinosa, estaquiosa, verbacosa, planteosa).

La sacarosa es uno de los productos finales de la asimilación clorofiliana y a través de ella se vehiculiza en las plantas prácticamen-

te toda la energía acumulada por la acción solar. Además de aquella acumulada en sus dos restos glucosa y fructosa, tiene la característica única entre los disacáridos conocidos de la presencia de una unión glucosídica, doblemente hemiacetálica, que está entre los compuestos clasificados como de "alto nivel energético" con un ΔF° de hidrólisis del orden de -6600 calorías, unión que juega sin duda un rol importante en su función biológica ([1]).

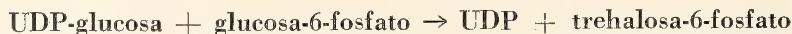
El metabolismo de la sacarosa es muy complejo y su conocimiento ha avanzado notablemente en los último años. Numerosos estudios fisiológicos han permitido establecer un esquema general de su formación, transporte y almacenamiento. Un paso fundamental fue el aislamiento y estudio de las enzimas que intervienen en su síntesis y transformaciones posteriores. Actualmente se está en la etapa de relacionar todos estos datos, a fin de aclarar los distintos aspectos de su metabolismo al nivel celular, en los distintos tejidos en la planta.

Es un hecho universal que su biosíntesis se realiza a través de la "activación" previa de la glucosa, con la formación de la uridina-difosfo-glucosa (UDP-glucosa), el que reaccionando con la fructosa (o la fructosa-fosfato) da origen a la sacarosa (o a la sacarosa-fosfato).

El primer indicio de la existencia de este mecanismo en plantas fue dado por los ensayos con algas unicelulares por Buchanan y colaboradores ([2]) : luego de un cierto tiempo de exposición al CO2 radioactivo y a la luz, demostraron que como productos de la asimilación clorofiliana, se marcan el UDP-glucosa y la sacarosa-fosfato, en forma rápida y secuencial. Posteriormente, el aislamiento del sacarosa-l-fosfato ([3]) llevó a la hipótesis de que éste fuera el primer derivado, a través de la reacción entre UDP-glucosa y el fructosa-l-fosfato.

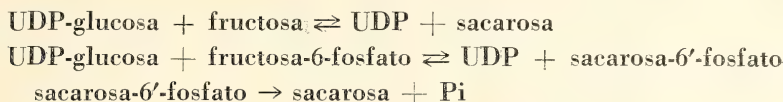
Simultáneamente, Leloir y Cabib ([4, 5]), descubrían el mecanismo de biosíntesis *in vitro* de un disacárido análogo, el trehalosa-6-fosfato.

Este disacárido es un componente normal en la levadura y además es un azúcar de reserva en hongos superiores y otros vegetales, como producto de actividad fotosintética en algunas hojas y como azúcar de transporte en la hemolinfa de algunos insectos. La biosíntesis demostrada en la levadura se hace a través de la siguiente reacción:



UDP-glucosa + glucosa-6-fosfato → UDP + trehalosa-6-fosfato

A partir de este descubrimiento fundamental, se demostró en plantas que la síntesis de la sacarosa se hace por mecanismo análogo, a través de dos reacciones (6-9):



UDP-glucosa + fructosa ⇄ UDP + sacarosa
UDP-glucosa + fructosa-6-fosfato ⇄ UDP + sacarosa-6′-fosfato
sacarosa-6′-fosfato → sacarosa + Pi

La primera enzima se denomina abreviadamente *sacarosa-sintetasa* (UDP-glucosa: D-Fructosa 2 glucosil transferasa) y la segunda sacarosa-fosfato sintetasa (UDP-glucosa: D-Fructosa-6-fosfato 2 glucosil transferasa).

Numerosos son los trabajos posteriores realizados sobre estas dos enzimas, cuya presencia y propiedades se han estudiado en una gran variedad de tejidos vegetales. Se han encontrado así en hojas, en cloroplastos aislados, en tejidos de reserva, tal como caña de azúcar y raíz de remolacha, en tubérculo de papa, de tupinambur y de tapioca, en semillas de gramíneas y de leguminosas, y en distintos frutos. Importantes revisiones se han publicado (10, 11).

Los resultados obtenidos en todos estos estudios son muy vastos y no siempre comparables, dado la distinta purificación de las enzimas utilizadas. Los hechos más relevantes son la especificidad de los distintos nucleótidos-azúcares, como dadores de los restos glucosilos, la reversibilidad y el significado biológico de ambas enzimas, la *sacarosa-sintetasa* y la *sacarosa-fosfato sintetasa*, en el metabolismo de los distintos tejidos vegetales.

Especificidad de los dadores de glucosa

El descubrimiento de la enzima se realizó utilizando el UDP-glucosa obtenido de fuentes naturales. La síntesis del ADP-glucosa por Recondo y Leloir (12) y su aislamiento posterior entre los primeros productos de la fotosíntesis (13) y en tejidos de reserva (14), llevó a investigar el posible rol en la reacción de formación de la sacarosa.

Los primeros ensayos fueron realizados por Recondo y Cardini (15) con *sacarosa-sintetasa* aisladas del germen de trigo y de endosperma de maíz, y utilizando como dadores el ADP-glucosa y otros nucleótidos sintéticos análogos. Se encontró que el ADP-glucosa y el TDP-glucosa eran, además de UDP-glucosa, buenos sustratos, variando su efectividad de acuerdo a la enzima estudiada. Así con la

enzima extraída del germen del trigo, el UDP-glucosa es el mejor sustrato, seguido por el ADP-glucosa. Un derivado sintético, al parecer no natural, el deoxi-UDP-glucosa, funciona mejor que el UDP-glucosa. Con la enzima extraída del endosperma de maíz, la relación de actividad disminuye desde el TDP-glucosa, el UDP-glucosa al ADP-glucosa.

Datos cinéticos más precisos fueron obtenidos por Fekete y Cardidini ([10]) con enzima de endosperma de maíz y, posteriormente, por otros autores, en enzimas de otras fuentes. El UDP-glucosa es el que tiene mayor afinidad con valores de Km que oscilan entre 0,2 a 1,6 mM. El ADP-glucosa, en general, tiene valores más altos del orden de 1 a 9 mM.

En algunos tejidos como en el tubérculo de tapioca, ambos tienen una constante igual, tanto de Km como Vmax ([17]). En la reversión de la reacción, la sacarosa da valores muy altos del orden de los 10 a los 100 mM, mientras que la fructosa da valores entre 2 y 6 mM. En el caso de la fructosa, el Km y la Mmax dependen del nucleótido-azúcar que se ha utilizado en la reacción (tabla I).

TABLA I

Constantes de afinidad (Km) y velocidades máximas ($V_{máx.}$) de diferentes nucleótido-azúcares

	Tubérculo de papa		Plántulas de *Phaseolus*	
	Km	$V_{máx.}$	Km	$V_{máx.}$
UDP-glucosa	1,65 mM	13.300	0,21 mM	140
ADP »	8,6 »	7.500	1,8 »	350
TDP »	1,0 »	3.700	1,7 »	170
GDP »	2,7 »	2.600	2,5 »	41
CDP »	—	—	2,5 »	49
Fructosa (UDP-glucosa)	—	—	2,0 »	140
» (ADP »)	—	—	23,0 »	210
» (TDP »)	—	—	35,0 »	75
» (GDP »)	—	—	35,0 »	61
» (CDP »)	—	—	35,0 »	19

* $V_{máx.}$ = nano moles/ml de enzima.
** $V_{máx.}$ = nanomoles/min/mg de proteínas.

En la tabla I figuran los resultados comparados de la *sacarosa*-sintetasa entre un tejido de reserva como la papa [18] y plántulas de *Phaseolus vulgaris* [19]. Como se observa, aunque el UDP-glucosa tiene mayor afinidad, no siempre tiene la máxima velocidad.

En todos los casos, el UDP-glucosa inhibe bastante la actividad de los otros nucleótidos-azúcares y, además, por el hecho de encontrarse en mucho mayor proporción en las plantas, parece, sin duda, que es el sustrato natural más utilizado. En cuanto al posible rol de los otros, los veremos al estudiar la reversión de la reacción.

En el caso de la *sacarosafosfato sintetasa,* actúan también en cierta medida todos los nucleótido-azúcares, aunque en los casos estudiados, el ADP-glucosa es mucho menos activo que el UDP-glucosa [18, 19]. Los valores de afinidad obtenidos por Mendicino [20] son de 7,4 mM para el UDP-glucosa y de 3,9 mM para el fructosa-6-fosfato.

Resultados interesantes sobre la influencia de la estructura del resto purínico o pirimídico de estos componentes han sido obtenidos por Budorsky y colaboradores [21] quienes estudiaron varios análogos sintético del UDP-glucosa y ADP-glucosa. La influencia de sustituir la glucosa por la 2-deoxiglucosa en el UDP-glucosa fue estudiada por Farkas y colaboradores [22].

Los trabajos de Albersheim y colaboradores [19], sobre la posibilidad de que exista un grupo de enzimas que trabajen cada uno con un nucleótido-azúcar diferente, parece demostrar que se trata de una sola, aun cuando los ensayos de inhibición cruzada parecen señalar que no es una simple reacción de competición por un solo lugar activo.

Reversibilidad de la reacción

Una de las características de la sacarosa-sintetasa es su fácil reversibilidad [6, 7]. Ninguna otra reacción conocida en la que UDP-glucosa interviene como dador de glucosa presenta esta característica que, aparentemente, tiene un gran significado bioiógico. La constante de equilibrio de reaccción:

$$\text{Keq.} = \frac{[\text{sacarosa}]\,[\text{UDP}]}{[\text{UDP-glucosa}]\,[\text{fructosa}]}$$

fue determinada con la sacarosa sintetasa del germen de trigo (6), es del orden de 5 a 37° y a pH 7,4. Los valores hallados oscilan entre 2 y 8 y esta falta de exactitud se debe a la interferencia de enzimas hidrolíticas. Con enzimas más purificadas, Avigad y Milner (23-24) obtienen valores de 1,3 y Akazawa y colaboradores (25) de 3,3. Con el ADP-glucosa como sustrato los valores son de 1,6 (5).

Usando el valor de —6600 calorías para el ΔF° de hidrólisis de la sacarosa, se puede calcular que el valor para la hidrólisis de la unión glucosa-fosfato en el UDP-glucosa es del orden de las —7600 valorías a pH 7,4 y a 37°. Esta reacción es función del pH, dado que se origina en la reacción un grupo fosfórico secundario: pasando de pH 6 a 8 el ΔF° sería de —1800 calorías (1). Recalculando estos datos, Neufeld y Hassid (10) obtienen un valor de —7000 cal. para la sacarosa y unos —8000 para la unión del UDP-glucosa. La alta energía de esta última unión posibilita termodinámicamente la fácil y reversible formación de la unión de la sacarosa.

En el caso de la *sacarosa-fosfato sintetasa*, es necesario trabajar con una enzima completamente libre de fosfatasa. Esta fue obtenida a partir del germen de trigo por Mendicino (20). Con esta enzima la constante de equilibrio de la reacción:

$$\text{Keq.} = \frac{[\text{UDP}]\,[\text{sacarosa-6'-fosfato}]}{[\text{UDP-glucosa}]\,[\text{fructosa-6-fosfato}]}$$

es de 3250 a pH 7,5. A pH 5,5 el Keq. es del orden de 53, unas 60 veces menos.

Con este valor de Keq. el valor del ΔF° de hidrólisis es del orden de —2700 cal.. para la unión glucosídica de la sacarosa-6-fosfato, valor sorprendentemente más bajo que el de la sacarosa (en unas —4000 cal.). Es difícil de explicar por qué la presencia de un grupo fosfato en el hidroxilo del C6 de la fructosa puede influenciar tanto la unión glucosídica. En el caso de derivados de la glucosa con un resto fosfórico en posición 6, ocurre algo similar, dada la estructura piranosa de la glucosa, que obliga durante la hidrólisis a una estructura semi-silla del ciclo, pero en el caso de la furanosa, el ciclo es planar. En cualquier forma una cierta diferencia entre los valores de hidrólisis es de esperar, porque en el caso de la sacarosa, su hidrólisis incluye unas —800 cal. de la transformación de la fructo-furanosa liberada a las formas de equilibrio con un 80 % de fructo-piranosa (Neufeld y Hassid) (10). En

el caso de la sacarosa-fosfato, la sustitución del hidroxilo en 6 del fructosa-6-fosfato impide esta isomeración.

Este gran desplazamiento del equilibrio hacia la síntesis de la sacarosa-fosfato lleva a la acumulación de este azúcar y si se acopla a la fosfatasa más o menos específica que existe en las células ([26]), que libera sacarosa, la reacción se hace irreversible. Esta irreversibilidad de la reacción, como veremos, parece funcionar en los tejidos que acumulan sacarosa.

La reversibilidad fácil de la reacción de la *sacarosa-sintetasa*, en cambio, ha sido objeto de varios estudios a fin de hallar si tiene alguna importancia metabólica, teniendo en cuenta que, a través de esta reacción de clivaje de la sacarosa, se pueden formar no sólo el UDP-glucosa, sino los otros nucleótidos-azúcares ([15, 16]). Sería ésta una forma de conservar la energía de unión de la sacarosa que, aparentemente, se pierde en la simple hidrólisis por las diversas invertasas descriptas.

Los primeros ensayos fueron realizados por Fekete y Cardini ([16]), con extractos de endospermas de maíz dulce. Se demostró la posibilidad de transformación de la sacarosa en UDP-glucosa y ADP-glucosa en sistemas naturales. Dado que ambos son sustratos esenciales para la síntesis de todos los polisacáridos celulares, se tendría el camino de utilizar la sacarosa que llega a éstos desde las hojas.

A. Milner y G. Avigad ([23, 24]), con enzima de remolacha encuentran que el TDP y ADP pueden actuar igual que el UDP, como aceptores de glucosilos y la relación de actividad es de: UDP (100), TDP (52), ADP (16). El CDP y GDP tienen una reacción muy lenta.

Estos autores demuestran que en la reacción de síntesis, la velocidad máxima tiene un pH distinto (entre 6.0 y 7.5) que en la de clivaje (entre 6.0 y 6.5). Además, la velocidad máxima de clivaje de la sacarosa es tres veces mayor que la de síntesis a pH 7,2 y cinco veces mayor a pH 6,0.

Una diferencia similar entre el pH de síntesis y clivaje fue señalado por Slabnik y colaboraodores ([18]) encontrando, además, que ciertos buffers inhiben el clivaje para la enzima de papa. Para la de tapioca ([17]) el pH de ambas reacciones es igual, e igualmente se encuentra la inhibición por algunos buffers. Además, la temperatura óptima es distinta para la reacción de síntesis (37°) que la de clivaje (45°).

Pressey [27], con enzima de papa obtiene también distintos pH para la síntesis (8,8) y el clivaje (6,6). Además, una reacción activadora grande del mercapto-etanol para la última.

Los ensayos de Pressey [27] y de Albersheim [19] se separar enzimas distintas para la síntesis y clivaje, han sido hasta ahora infructuosos. De todas formas, la reversibilidad de la reacción parace que es más complicada que una simple reversión.

Todos estos resultados parecen indicar que la reversión de la reacción de la *sacarosa-sintetasa* puede ser utilizada para la síntesis del UDP-glucosa que es, a su vez, el mejor sustrato para su síntesis. En cambio, dada la gran inhibición del UDP, no hay datos para suponer una reversión normal de la síntesis para formar los demás nucleótidos-azúcares derivados de la adenina, timina, citidina y guanina. Esto resulta de las condiciones reproducibles *in vitro*, pero cuál es la situación real en la célula se desconoce. Albersheim y colaboradores [28] emiten la hipótesis de que en los cloroplastos la reacción predominante sea la síntesis de la sacarosa a través de la *sacarosa-fosfato sintetasa* que actuaría a través de la reacción de clivaje, con formación de los distintos nucleótido-azúcares. Esta hipótesis se basa principalmente en la distribución de ambas enzimas.

Significado de las dos enzimas

En plantas, prácticamente, sólo se encuentra sacarosa al estado libre. El aislamiento de la sacaroso-fosfato no es fácil y es poco probable que se acumule, porque, aparentemente, se hidroliza por acción de una fosfatasa, tan pronto se forma. Sin embargo, el aislamiento en muchos tejidos de la *sacarosa-fosfato sintetasa* hace que tenga algún sol biológico. No se conoce, por otra parte, ningún otro mecanismo de su formación que a través de esta enzima, habiendo fracasado los intentos de demostrar la presencia de una enzima que fosforile la sacarosa a través del ATP.

Existen una serie de pruebas fisiológicas que señalan que la sacarosa-fosfato juega un rol esencial en el metabolismo. Los principales resultados se obtuvieron mediante el uso de la marcación con radioactivos, durante la asimilación clorofiliana en hojas o en cloroplastos aislados. La cinética de marcación indica que el primer producto formado a partir del fructosa 1,6-difosfato, sería el fructosa-6-fosfato que, a través del glucosa-6-fosfato y glucosa-1-fosfato y UDP-glucosa, daría sacarosa-fosfato, que luego se hidroliza dando sacarosa libre [3, 29, 30, 31].

El paso siguiente fue estudiar la presencia de la enzima en los cloroplastos o en las hojas. Los resultados son contradictorios. Mendicino (20) demuestra la *sacarosa-sintetasa* en cloroplastos. Igualmente, Frydman y Hassid (32), quienes, además, no pueden demostrar la presencia de *sacarosa fosfato sintetasa.*

Trabajando con cloroplastos de Nicotiana preparados en medio no acuoso, Bird, Porter y Stocking (33), demuestran la presencia de ambas enzimas y, además, aislan la sacarosa-fosfato formada.

En cambio, Delmer y Albersheim (28), trabajando con cloroplastos aislados en medio acuoso de plántulas de *Phaseolus aureus* encuentran sólo *sacarosa fosfato sintetasa,* que desaparece por sonicación. La *sacarosa sintetasa* está presumiblemente ausente.

La formación enzimáticas de sacarosa-fosfato fue tmbién demostrada por Hatch (34) en tallos y hojas de caña de azúcar.

Es interesante señalar que tanto en los cloroplastos como en la caña de azúcar hay acumulación, transiente en el primer caso, de sacarosa libre y que esta acumulación no puede explicarse aparentemente por la simple acción de una reacción reversible como la de *sacarosa sintetasa.*

En cambio, la formación de sacarosa por el segundo mecanismo, es, de acuerdo a lo que hemos señalado, casi irreversible. Muy interesantes son, en este sentido, los trabajos de Hatch (35) en la caña de azúcar|

Sus resultados parecen indicar que en las células existe un compartimiento de acumulación, en donde la síntesis se hace por el mecanismo de formación de sacarosa-fosfato y posterior hidrólisis irreversible a sacarosa libre. Una evidencia obtenida es que la *sacarosa sintetasa* está asociada al tejido vascular y no al parénquima de reserva. En el primero, funcionaría la reacción de clivaje resintetizándose los diferentes nucleótido-azúcares. La sacarosa penetraría en las células, previa inversión en el espacio intercelular.

La existencia de compartimientos para la sacarosa ha sido señalada también en papas, pero no parece en este caso requerirse la formación previa de sacarosa-fosfato (37). Los trabajos sobre cortes de este tubérculo, señalan que la regulación de las dos enzimas se hace, aparentemente, por un mecanismo distinto (38).

La existencia de compartimientos ha sido estudiada extensamente por Humphrey y Garrad (39), quienes señalan que en el escutelo de la semilla de maíz hay una entrada de sacarosa sin previa hidrólisis y el mecanismo de acumulación sería:

(citoplasma) : sacarosa + UDP → UDP-glucosa y fructosa
(vacuola) : UDP-glucosa + fructosa-6-fosfato → sacarosa-6-fosfato + UDP-sacarosa-6-fosfato → sacarosa + Pi

Interesante, desde el punto de vista de la regulación, son los trabajos de Preiss ([40]) quien, en la *sacarosa-fosfato sintetasa*, encuentra una activación alostérica del fructosa-6-fosfato.

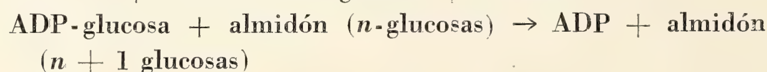
Interconversión entre la sacarosa y el almidón

Una fenómeno biológico muy conocido en las plantas es la estrecha relación metabólica entre la sacarosa y el almidón. Se ha encontrado esta relación en semillas en maduración, en las hojas durante la asimilación clorofiliana, en los tallos de los árboles durante los cambios estacionales y en las conocidas modificaciones reversibles del contenido en azúcar de las papas por enfriamiento.

Esta estrecha vinculación lleva a pensar que existe algún mecanismo por el cual se conserva la energía unida en las uniones glucosídicas, especialmente en el caso de la sacarosa.

El primer estudio al nivel enzimático fue realizado por Fekete y Cardini ([16]) en un tejido en donde existe una rápida formación de almidón a partir de la sacarosa como es el endosperma de maíz inmaduro. Se demostró la presencia de enzimas capaces de realizar la transformación:


Sacarosa + ADP ⇄ ADP-glucosa + fructosa

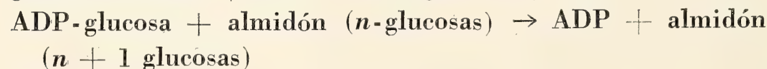

ADP-glucosa + almidón (n-glucosas) → ADP + almidón (n + 1 glucosas)

El estudio cinético de las distintas reacciones y de la acción del UDP-glucosa y del UDP sobre las mismas, parecen indicar que aunque este camino a través del ADP-glucosa es factible, mucho más probable es un camino algo más complejo:


Sacarosa + UDP → fructosa + UDP-glucosa


UDP-glucosa + PPi → UTP + glucosa-1-fosfato


glucosa-1-fosfato + ATP → ADP-glucosa + PP


ADP-glucosa + almidón (n-glucosas) → ADP + almidón (n + 1 glucosas)

La energía en todo el proceso proviene del ATP. Este mecanismo fue econtrado posteriormente también en endosperma de arroz por

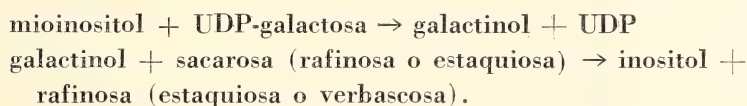
Akazawa y colaboradores ([25]) y estudiado por Fekete ([41]) en el endosperma de habas.

En cuanto al proceso inverso de formación de sacarosa a partir de almidón, varios son los mecanismos posibles, siendo el que va a través de la fosforilasa el único que conserva la energía de las uniones glucosídicas. La reacción de síntesis a través del ADP-glucosa (o UDP-glucosa) es irreversible. Un tal mecanismo a través de la fosforilasa fue estudiado en endosperma de habas por Fekete ([41]).

Biosíntesis de oligosacáridos derivados de la sacarosa

Existen distribuidos en muchos vegetales una serie de oligosacáridos, de función metabólica no conocida, en los cuales uno o varios restos galactosilos se encuentran fijados sea a la fructosa o a la glucosa de la sacarosa. Los más difundidos son la rafinosa, la estaquiosa y verbascosa (mono-, di- y trigalactosil sacarosa).

Los trabajos fundamentales de Kandler y colaboradores ([42, 43]), demostraron que la biosíntesis de estos compuestos se realiza por incorporación de restos galactosilos sobre la sacarosa como primer aceptor para dar rafinosa o sobre la rafinosa o estaquiosa en los dos últimos. El dador original de los restos galactosilos es el UDP-galactosa, pero el proceso no es directo sino a través de la formación del galactinol (mio-inositol-galactosido), cuya biosíntesis a través del UDP-galactosa y mioinositol fue señalado ya por Frydman y Neufeld ([44]). El proceso completo es el siguiente:


mioinositol + UDP-galactosa → galactinol + UDP
galactinol + sacarosa (rafinosa o estaquiosa) → inositol + rafinosa (estaquiosa o verbascosa).

Además, se ha demostrado la existencia de una enzima que transfiere grupos galactosilos entre la sacarosa y la rafinosa y entre los oligosacáridos superiores ([43, 45]).

BIBLIOGRAFIA

1. Leloir, L. F., Cardini, C. E. y Cabib, E., *Utilization of free energy for the biosynthesis of saccharides, in comparative biochemistry.* M. Florkin y H. S. Mason, ed. vol. II, 97-138, Academic Press (1960).
2. Buchanan, J. G. y colaboradores, *Phosphorus metabolism,* II, 440, John Hopkins Press, Baltimore (1952).

3. Buchanan, J. G., Arch. Bioch. Bioph., *44*, 140 (1953).
4. Leloir, L. F. y Cabib, E., Jour. Amer. Chem. Soc., *75*, 5445 (1953).
5. Cabib, E, y Leloir, L. F., J. Biol. Chem., *231*, 259 (1958).
6. Leloir, L. F. y Cardini, C. E., Jour. Amer. Chem. Soc., *75*, 6084 (1953).
7. Cardini, C. E., Leloir, L. F. y Chiriboga, J., J. Biol. Chem., *214*, 149 (1955).
8. Leloir, L. F. y Cardini, C. E., J. Biol. Chem., *214*, 157 (1955).
9. — *UDP-glucose Transglucosylase from wheat germ.* Methods of Enzymology, V, pág. 167 y 170. Academic Press (1962).
10. Neufeld, E. F. y Hassid, W. Z., *Biosynthesis of saccharides from glycopyranosyl esters of nucleotides sugar (nucleotides). Advances in carbohydrate. Chemistry, 18,* 309. Academic Press (1963).
11. Leloir, L. F., *Nucleoside Diphosphate sugars and saccharide synthesis.* 4th Hopkins Memorial Lecture. Bioch. J., *91*, 1 (1964).
12. Recondo, E. y Leloir, L. F., Bioch. Bioph. Res. Comm., *6*, 85 (1961).
13. Kauss, H. y Handler, O., Z. Naturfors., *17 B*, 858 (1962).
14. Recondo, E., Dankert, M. y Leloir, L. F., Bioch. Bioph. Res. Comm., *12*, 204 (1963).
15. Cardini, C. E. y Recondo, E., Plant and Cell Physiol., *3*, 313 (1962).
16. Fekete, M. A. R. de y Cardini, C. E., Arch. Bioch. Bioph., *104*, 173 (1964).
17. Shukla, R. N. y Sanwal, G. G., Arch. Bioch. Bioph., *142*, 303 (1971).
18. Slabnik, E., Frydman, R. B. y Cardini, C. E., Plant Physiol., *43*, 1063 (1968).
19. Grimes, W. J., Jones, B. L. y Albersheim, P., J. Biol. Chem., *245*, 188 (1970).
20. Mendicino, J., J. Biol. Chem., *235*, 3347 (1960).
21. Budorsky, E. I. y colaboradores, Bioch. Bioph. Acta, *122*, 213 (1966); *185*. 478 (1969).
22. Farkas, V., Buly, P. y Bauer, S., Bioch. Bioph. Acta, *165*, 63 (1968).
23. Milner, Y, y Avigad, G., Nature, *206*, 825 (1965).
24. Avigad, G. y Milner, Y., Methods of Enzymology, VIII, 341, Academic Press (1966).
25. Murata, T., Sugiyama, T., Minimikawa, T. y Akazawa, T., Arch. Bioch. Biophys., *113*, 34 (1960).
26. Hawker, J. S., Phytochemistry, *5*, 1191 (1966).
27. Pressey, R., Plant Physiol., *44*, 759 (1969).
28. Delmer, D. P. y Albersheim, P., Plant Physiol., *45*, 782 (1970).
29. Gibbs, M., Latzko, E., Garth Everson, R. y Cockburn, W., Harvesting the Sun, pág. 111, Academic Press (1967).
30. Bassham, J. A. y Jensen, R. G., Harvesting the Sun, pág. 79, Academic Press (1967).
31. Bean, R. C., Barr, R. K., Welch, H. V. y Porter, G. G., Arch. Bioch. Bioph., *96*, 524 (1962).
32. Frydman, R. B. y Hassid, W. Z., Nature, *199*, 382 (1963).
33. Bird, I. F., Porter, H. K. y Stocking, C. R., Bioch. Biophys. Acta, *100*, 366 (1965).
34. Hatch, M. D., Biochem. Jour., *93*, 521 (1964).
35. Hatch, M. D., Sacher, J. A. y Glasziou, K. T., Plant Physiol., *38*, 338 (1963).
36. Hatch, M. D., Biochem. J., *88*, 423 (1963).
37. Hardy, P. J. y Norton, G., New Phytol., *67*, 139 (1968).

38. Lavintman, N. y Cardini, C. E., Plant Physiol., *43*, 434 (1968).
39. Humphrey, T. E. y Garrad, L. A., Phytochemistry, *9*, 1715 (1970).
40. Preiss, J. y Greenberg, E., Bioch. Biophys. Res. Comm., *36*, 289 (1969).
41. Fekete, M. A. R. de, Planta, *87*, 311 y 324 (1969).
42. Tanner, W. y Kandler, O., European J. Biochem., *4*, 233 (1968).
43. Lehle, L., Tanner, W. y Kandler, O., H. S. Z. Phys. Chem., *351*, 1494 (1970).
44. Frydman, R. B. y Neufeld, E. F., Bioch. Biophys. Res. Comm., *12*, 121 (1963).
45. Moreno, A. y Cardini, C. E., Plant Physiol., *41*, 909 (1966).

SOBRE EL METABOLISMO DE LOS POLIMEROS DE FRUCTOSA

Por HORACIO G. PONTIS

Departamento de Biología, Fundación Bariloche
Casilla de Correo 138, San Carlos de Bariloche

Los fructosanos son un grupo de polisacáridos que se encuentran en plantas angiospermas (mono y dicotiledóneas), principalmente en Compuestas y Gramíneas, familias que si bien están muy separadas taxonómicamente se consideran entre las más evolucionadas del reino vegetal (1). La presencia de fructosanos en vegetales no está relacionada con la presencia o ausencia de almidón. Así por ejemplo en Allium (cebolla) no se encuentra almidón pero sí fructosanos, mientras que en otras plantas como en Iris foetidissima ambos polímeros coexisten en el mismo tejido, o por el contrario en Helianthus tuberosus (topinambur) los dos tipos de polisacáridos se encuentran en distintas partes de la misma planta: almidón en la hoja y fructosanos en los tubérculos (2).

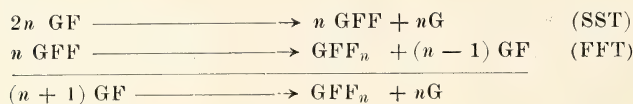
Los fructosanos son polímeros de fructosa que contienen una glucosa terminal, es decir responden a la fórmula general G - F(F)n. Se Se puede dividir a los fructosanos en dos grupos: inulinas y fleínas (3). Inulinas son polímeros donde la fructosa se encuentra unida en forma β 2-1, y se los halla fundamentalmente en especies de la familia de Compuestas. Los fructosanos que se aislan de plantas forrajeras, son en general del tipo fleína y en ella los fructosanos están unidos en forma β 2-6. Ambos tipos de fructosanos tienen un bajo grado de polimerización si se los compara con almidón. Las moléculas de fructosanos más grandes se las encuentran en los tallos de ciertas forrajeras, por ejemplo, timoteo donde llega a un grado de polimerización de 260.

A pesar que los fructosanos se encuentran ampliamente diseminados en el reino vegetal, el conocimiento que se tiene sobre su fisio-

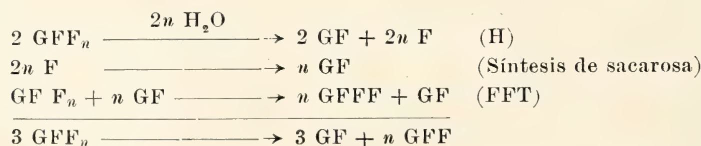
logía y bioquímica es relativamente escaso. La información existente sobre su biosíntesis y degradación proviene principalmente de los trabajos de Edelman y sus asociados (4), quienes han descripto tres enzimas presentes en extractos de tubérculos de Helianthus tuberosus (topinambur): sacarosa-sacarosa 1-fructosiltransferasa (SST), fructosan-fructosan 1-fructosiltransfera (FFT) y fructosan-1-fructosan hidrolasa (H). La primera cataliza la síntesis del trisacárido fructosilsacarosa, mientras que la segunda cataliza la transferencia de grupos fructosilo a otros fructosanos y la tercera la hidrólisis de los polímeros.

En Helianthus tuberosus los fructosanos son almacenados en el tubérculo. Durante el ciclo de vida del tubérculo, que dura aproximadamente un año, el contenido en fructosanos se modifica. Hay un período de síntesis y acumulación que alcanza su pico en el verano, seguido por un período de depolimerización durante la invernación (dormancia) (5). Estos cambios están asociados con el nivel de las enzimas presentes en el tubérculo y de acuerdo a Edelman (4) la acción combinada de las enzimas mencionadas anteriormente permitiría explicar la síntesis y degradación de fructosanos según las siguientes reacciones (4):

I. Acumulación de polímeros durante la formación del tubérculo (verano):



II. Conversión de inulina a oligosacáridos durante invernación (dormancia):



Es interesante señalar que las enzimas indicadas sufren una variación estacional. Así sólo es posible detectar sacarosa-sacarosa 1-fructosilsintetasa o fructosil-sacarosa sintetasa (SST) durante la formación del tubérculo, es decir en verano. Por el contrario fructosan hidrolasas sólo aparecen durante la invernación (dormancia) y estas enzimas no se pueden detectar si el tubérculo maduro es

mantenido a una temperatura de 25° ([6]). En ese caso se debe señalar que no ocurre depolimerización. Trabajando con explantas de Helianthus tuberosus se ha podido reproducir los cambios estacionales que ocurren en el tubérculo, y Pontis ([7]) ha mostrado que es necesario que ocurra síntesis de proteínas *de novo* para que tenga lugar la formación de polímeros *in vivo*, y esta síntesis puede ser afectada por acción hormonal. También se ha demostrado que la iniciación de la síntesis de polímeros depende de los niveles celulades de sacarosa y de fructosil-sacarosa ([8]). En la figura 1 puede ver-

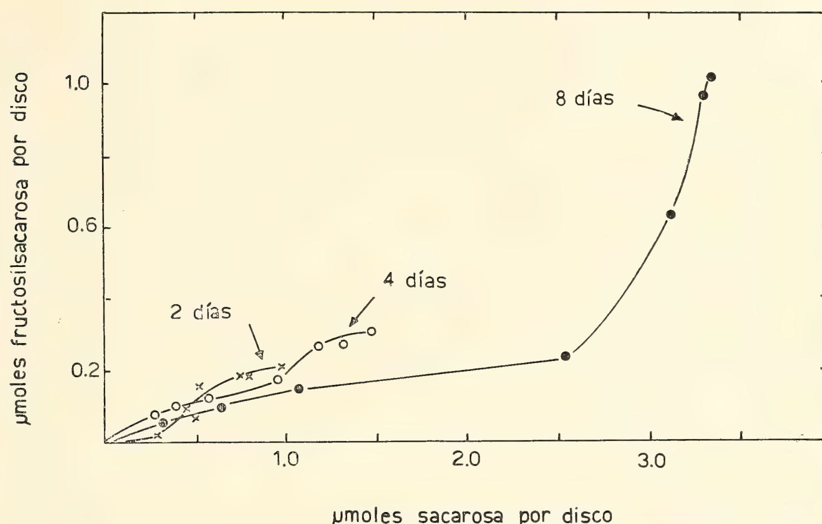


Fig. 1. — Influencia del nivel de sacarosa en explantas, en la formación de fructosil-sacarosa a diferentes tiempos de crecimiento. Explantas de Helianthus tuberosus fueron crecidos en medio Heller, adicionado de concentraciones distintas de glucosa (0,001 a 0,2 M). A los tiempos indicados se determinó el contenido de sacarosa y fructosil-sacarosa en los discos.

se cómo el nivel FS es función de la concentración de sacarosa, y resultados preliminares indican que fructosilsacarosa sintetasa sería inducida por sacarosa. Si explantas se cultivan en medio nutritivo al cual se ha añadido cloranfenicol, la inducción no tiene lugar.

Estos resultados así como los de Edelman y sus asociados parecen indicar que el metabolismo de fructosanos puede ser regulado a través de los niveles de sacarosa en el tejido. Sin embargo, numerosas preguntas todavía necesitan respuestas para poder completar el esquema sugerido por Edelman para la síntesis y degradación de fructosanos. Entre otras, ¿cuál es el papel de uridina difosfato fruc-

tosa encontrado en tubérculos de Dalia (9) y Helianthus tuberosus? (10) ¿Cuáles son las señales que controlan la desaparición del de fructosil-sacarona sintetasa de los tubérculos apenas éstos son separados de la planta, y la aparición de las hidrolasas durante dormancia?

Si bien nuestro conocimiento sobre la bioquímica de los polímeros de fructosa ha avanzado considerablemente en los últimos años, poco o nada se conoce todavía sobre el rol fisiológico de los fructosanos. Su presencia se la ha relacionado con la resistencia para soportar condiciones climáticas adversas como heladas y sequías, ya que muchas plantas que contienen fructosanos pueden soportar esas condiciones durante su ciclo de vida (11). Es interesante señalar en este sentido los experimentos de Smith con plantas forrajeras (12). Cuando plantas de timoteo se someten a un régimen de temperaturas diurno/nocturno de 18,5°/10°, los fructosanos llegan a alcanzar en hojas y tallos un por ciento basado en material seco de 22 a 30 % respectivamente. En las mismas plantas un régimen de temperaturas de 29,5°/21° los fructosanos sólo alcanzan por el contrario a 0,7 y 10 %. Debe también mencionarse que los pastos forrajeros perennes, nativos de latitudes templadas acumulan fructosanos y sacarosa en sus tallos y rizomas. Por el contrario, aquellos nativos de áreas semitropicales o tropicales almacenan almidón y sacarosa (13 y 14).

Una propiedad curiosa de los fructosanos presentes en el tubérculo en invernación es que si bien el contenido en fructosa del tubérculo puede sufrir grandes variaciones en valor absoluto, siempre el contenido en fructosa de un polímero a otro está en relación unitaria. Es decir, el peso del fructosano de grado *n* expresado en peso de fructosa es igual al del polímetro de grado *i*. Esto equivale a decir que la concentración molar de cada término de la serie es menor que la del precedente. Una serie de este tipo puede proporcionar un mecanismo que permite el cambio rápido en tamaño y número de las moléculas y de allí un rápido cambio en la presión osmótica. En otras palabras, la función de los fructosanos sería proporcionar a la planta con un sistema regulador de la presión osmótica.

BIBLIOGRAFIA

1. Archbold, H. K., New Phytologist, *39*, 185 (1940).
2. Bacon, J. S. D. y Edelman, J., Biochem. J., *48*, 114 (1951).
3. Whistler, R. L. y Smart, C. L., Polysaccharide Chemistry, pág. 276, Academic Press, New York, 1953.
4. Edelman, J. y Jefford, T. G., New Phytologist, *67*, 517 (1968).
5. Bacon, J. S. D. y Loxley, R., Biochem. J., *51*, 208 (1952).
6. Scott, R. W., Thesis, University of London, 1961.
7. Pontis, H. G., Arch. Biochem. Biophys., *116*, 416 (1966).
8. — Physiologia Plantarum, *23*, 1089 (1970).
9. González, N. S. y Pontis, H. G., Biochim. Biophys. Acta, *69*, 179 (1963).
10. Umemura, Y., Nakamura, M. y Funahashi, S., Arch. Biochem. Biophys., *119*, 240 (1967).
11. Eagles, C. F., Ann. Bot. N. S., *31*, 645 (1967).
12. Smith, D., Crop Science, *8*, 331 (1968).
13. Smith, D. y Grotelueschen, R. D., Crop Science, *6*, 263 (1966).
14. Weinmann, H. y Reinhold, L., J. South Afr. Bot., *12*, 57 (1946).

BIOSINTESIS DEL ALMIDON

Por ROSALIA B. FRYDMAN

Departamento de Bioquímica Vegetal, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires

RESUMEN

En este trabajo de revisión se discuten selectivamente los problemas inherentes a la biosíntesis del gránulo de almidón. Se discuten las propiedades de las enzimas almidón-sintetasa (nucleótido-glucosil transferasa) particulada y soluble. Se describe también el aislamiento y las propiedades de una fosforilasa novel, capaz de sintetizar al polisacárido lineal amilosa y al polisacárido ramificado amilopectina a partir de glucosa-1-fosfato, sin la participación de ningún aceptor exógeno. Su interacción con la enzima ramificante da lugar al polisacárido ramificado. Se discute la posible interacción de las tres enzimas: la fosforilasa, la enzima ramificante y la almidón sintetasa, en el proceso de biosíntesis del gránulo de almidón.

ESTRUCTURA DEL GRANULO DE ALMIDON

El almidón es el material de reserva de energía de las plantas, así como el glucógeno lo es de los animales, y se encuentra en la naturaleza en forma de gránulos organizados. Estos están localizados en la célula dentro de organelas incoloras denominadas plástidos o leucoplastos. Cuando los plástidos se especializan en el almacenamiento del almidón se denominan amiloplastos, y pueden contener uno o más gránulos de almidón. Los plástidos especializados en fotosíntesis (cloroplastos) también sintetizan un almidón de ciertas características especiales que se denomina almidón de asimilación, ya que se sintetiza durante el período luminoso y es utilizado (o asimilado) durante el período de oscuridad. La forma física y la

composición química de los gránulos de almidón en tejidos de reserva está estrechamente relacionado al genotipo y a la fisiología de la planta que los produce.

El almidón está formado por dos polímeros, la amilosa y la amilopectina, cuya unidad repetitiva es el mismo monómero, *α-D*-glucopiranosa. Los dos polímeros fueron cuantitativamente separados del gránulo por primera vez en 1942 por Meyer ([1]). La mayoría de los gránulos de almidón contienen un 20 % de amilosa, un polímero esencialmente lineal en el cual las glucosas están unidas en uniones $\alpha, 1 \rightarrow 4$. Su peso molecular oscila entre 10^5 y 10^6. Algunas evidencias ([2, 3]) parecen indicar la presencia de una cierta ramificación dentro de estas moléculas lineales.

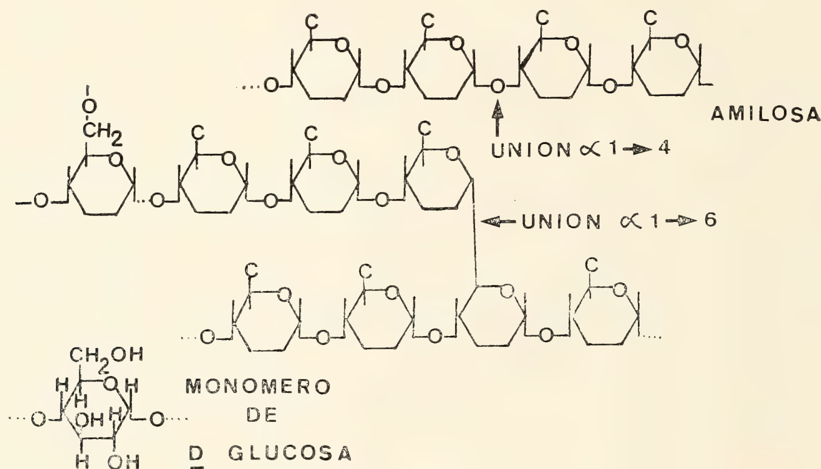


Figura 1

El polímero presente en mayor proporción es la amilopectina, que es un polímero idéntico a la amilosa pero ramificado. Estas ramificaciones de 20 a 30 uniones glucosídicas unidas en forma $\alpha\, 1 \rightarrow 4$ están insertadas en el esqueleto en uniones $\alpha\, 1 \rightarrow 6$ (Fig. 1) confiriéndole una estructura arborescente y un peso molecular que excede al de la amilosa (entre 10^7 y 10^8)

Las propiedades físicas y químicas de ambos componentes del almidón difieren apreciablemente. La amilosa tiene una gran tendencia a precipitar espontáneamente de soluciones acuosas, mientras que la amilopectina es mucho más soluble y no precipita.

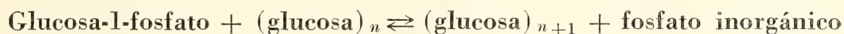
La mayoría de los gránulos de almidón contiene ambos polímeros pero la proporción entre ambos es muy variable. El almidón de

cereales de la variedad "cérea" ("Waxy") está compuesto exclusivamente por amilopectina. El almidón de una variedad de arveja, la arveja arrugada, está formado por un 65 % o más de amilosa. Esta variación en las propiedades de los gránulos es notable si se toma en cuenta que su química y bioquímica deberían ser iguales y que todos los plástidos tienen la capacidad fundamental de sintetizar almidón como uno de sus componentes básicos. Esto sugiere la presencia de una serie de factores que transforman la biosíntesis del gránulo de almidón en las plantas en un proceso variable y muy complejo del que hasta hoy en día se desconocen sus detalles. Discutiremos a continuación la biosíntesis de los dos componentes principales del gránulo de almidón.

ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA BIOSINTESIS DEL ALMIDON

a) Estudios previos.

La fosforilasa fue una de las primeras enzimas aisladas que se consideraron involucradas en la biosíntesis del almidón, juntamente con la enzima Q o ramificante [4]. La primera fue aislada de vegetales por Hanes en 1940 [5] habiendo sido descripta con anterioridad por los esposos Cori en tejidos animales [6]. Esta enzima cataliza las siguiente reacción reversible



$$\text{Glucosa-1-fosfato} + (\text{glucosa})_n \rightleftarrows (\text{glucosa})_{n+1} + \text{fosfato inorgánico}$$

donde $(\text{glucosa})_n$ indica un polisacárido de glucosas unidas por uniones α - 1 → 4. El equilibrio era afectado únicamente por la relación de concentraciones de glucosa-1-fosfato a fosfato inorgánico y no por la concentración del aceptor de la glucosa. La presencia de un aceptor, cuyo mínimo grado de polimerización era de tres unidades glucosas (Maltotriosa), era absolutamente necesario para que la fosforilasa actuase. La otra enzima mencionada, o sea la Q enzima era la que ramificaba el polisacárido lineal α-1 → 4. Catalizaba una reacción de intercambio glucosídico en el cual una unión α 1 →4 se convertía en una unión α 1 → 6. Se supuso que si la fosforilasa era capaz de sintetizar a partir de aceptor de tres (mejor aún de cuatro) unidades glucosídicas un polímero lineal tipo amilosa y luego con la ayuda de la enzima ramificante daba origen a la amilopectina, la biosíntesis de ambos componentes esta-

ba resuelta. Esto sería cierto si la función de la fosforilasa *in vivo* fuese de síntesis y no de degradación de los polisacáridos. En el caso del glucógeno todo evidenciaba que la función de la fosforilasa era la de degradación (7, 8), hecho que fue luego absolutamente demostrado (9).

En el caso del almidón también surgieron evidencias que la fosforilasa podría no estar involucrada en la síntesis del gránulo (10) y el papel de la fosforilasa quedaba sin aclarar.

Se aislaron en el ínterin otras enzimas que parecían estar ligadas a la biosíntesis del almidón, pero su función en la formación del gránulo es aún absolutamente desconocida. Eran, la T-enzima (11), que catalizaba la reacción:



$$2 \text{ maltosa} \rightarrow \text{panosa} + \text{glucosa}$$

La panosa es un trisacárido de glucosa que tenía una unión $\alpha, 1 \rightarrow 4$ y otra $\alpha, 1 \rightarrow 6$. La otra enzima era la D-enzima (12), denominada así pues disproporcionaba oligosacáridos de acuerdo al siguiente esquema:



$$2 \text{ Maltotriosa} \rightleftarrows \text{glucosa} + \text{Maltopentaosa.}$$

b) Transglucosilasas particuladas.

El descubrimiento de los nucleótidos azúcares y su función en la biosíntesis de oligo y polisacáridos por Leloir y sus colaboradores, abrió un nuevo horizonte en la biosíntesis del almidón. En 1960 Leloir, Cardini y Fekete (13, 14), detectaron por primera vez en los gránulos del almidón una enzima que era capaz de transferir una glucosa a partir de un nucleótido azúcar, la uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), a ambos componentes del gránulo de almidón. La nueva unión que se formaba era una unión $\alpha, 1 \rightarrow 4$. Esta transferencia también se podía hacer, por la enzima que se encontraba en el gránulo, a oligosacáridos tan pequeños como la maltosa dando lugar a oligosacáridos de peso más elevado. Posteriormente, Recondo y Leloir encontraron (15) que la adenosina-difosfato-glucosa (ADP-glucosa) era un donor glucosídico mucho más eficiente. En la tabla I pueden verse las especificidades de algunos almidones de reserva y de asimilación frente a los nucleótidos azúcares (16).

TABLA I

Especificidad de donor de almidón-sintetasas particuladas

Origen del complejo « almidón-sintetasa »	Nucleótido azúcar	Incorporación a	
		Gránulo de almidón %	Maltotetraosa %
Papa	ADP-glucosa	36	20
	UDP »	11,5	12
	TDP »	6	12
	GDP »	1,4	1,4
Maíz waxy	ADP-glucosa	4	15
	UDP »	0,7	4
	TDP »	1	6
	GDP »	0,5	5
Arveja arrugada.	ADP-glucosa	31	30
	UDP »	10	10
	TDP »	1,8	5
	GDP »	2,3	2,5
Choclo dulce....	ADP-glucosa	55	
	UDP »	40	
	TDP »	10	
	GDP »	17	
Hojas de geranio	ADP-glucosa	19	3
	UDP »	0,1	0,1
	GDP »	0,1	0,1

Es interesante señalar que los almidones de asimilación tienen aparentemente una absoluta especificidad hacia la ADP-glucosa. Una característica de estas almidón sintetasas unidas al gránulo, era su baja afinidad hacia el nucleótido azúcar (Km para el almidón de papa, (4×10^{-2}) [16]. Existen evidencias para afirmar que esta baja afinidad se puede deber a cierto impedimento de penetración o de intercambio entre el complejo enzima-almidón y el donor de la glucosa, ya que por rotura mecánica o química del gránulo la afinidad se incrementaba [16, 17]. Las almidón sintetasas unidas al gránulo diferían en sus propiedades no sólo en los diversos vegetales sino aún en el embrión y el endosperma del mismo vegetal [18]. Estas diferencias pueden deberse a diferencias en la constitución de los almidones y por ende a los medios sólidos en los cuales están incluidas las enzimas [16].

El ión K^+ parecía tener un efecto activador sobre las almidón sintetasas particuladas ([19]), y un efecto similar se encontró con otros iones ([17]). Como ocurre con otras nucleotido-glucosil transferasas las reacciones que catalizan son absolutamente irreversibles.

c) Almidón sintetasas solubles.

Debido a que estas enzimas, las gránulo-enzimas, estaban íntimamente unidas al gránulo y su mejor aceptor era el mismo gránulo era difícil pensar que fuesen las responsables del mecanismo de formación del almidón *de novo*. Debía existir una enzima soluble en las células que tuviera propiedades similares a las de la almidón sintetasa, pero que actuase sobre un aceptor soluble del tipo de la amilosa, de la amilopectina, o del tipo de los oligosacáridos para dar origen a un mayor grado de polimerización. Una enzima así se detectó en choclo dulce ([20]) y se vio que era responsable de la biosíntesis del fitoglucógeno. Era una enzima soluble que tenía una absoluta especificidad para la ADP-glucosa y era capaz de transferir la glucosa a aceptores del tipo de los oligosacáridos (comenzado con la maltosa) y a polisacáridos ramificados del tipo del glucógeno y de la amilopectina.

Las nuevas uniones formadas eran del tipo $\alpha, 1 \rightarrow 4$ y su mecanismo parecía ser muy similar al de la enzima absorbida al gránulo. Una enzima similar fue encontrada en todos los vegetales que sintetizaban almidón, incluyendo los cloroplastos y la papa ([21-24]), La tabla II muestra las actividades comparativas de estas almidón sintetasas solubles.

TABLA II

Actividades relativas de las almidón sintetasas solubles de diferentes orígenes

Fuente de enzima	Actividad µmoles de ADP/mg proteína
Choclo dulce	141
Arveja	51
Arveja arrugada	25
Poroto de soja	33
Maíz waxy	36

Estas enzimas tenían un absoluto requerimiento por un aceptor, siendo los mejores los aceptores ramificados del tipo de la amilopectina o del glucógeno. Transferían la glucosa exclusivamente a partir de la adenosina-difosfato-glucosa. Es interesante señalar que estas enzimas también se encontraron en plantas que no contenían almidón como polisacárido de reserva, como ser los tubérculos de tupinambo ([25]) y las semillas de soja ([26]), en los cuales recién aparecía el almidón al germinar ([27]). El gránulo del almidón en el cual se había inactivado la almidón sintetasa particulada no era sustrato de la almidón sintetasa soluble. Sólo en extractos papa ([21] y [28]) pudo encontrarse una enzima que utilizase como sustrato gránulos de almidón en los que se había inactivado la enzima particulada.

La diferencia más notable entre las glucosiltransferasas solubles y las ligadas al gránulo era su especificidad frente a los nucleótidos azúcares. Esto podía explicarse diciendo que eran dos enzimas diferentes o dos formas diferentes de la misma enzima. La molienda de los gránulos de almidón causaba profundos cambios en las propiedades de la almidón sintetasa absorbida. La más notable era la desaparición de la especificidad en la actividad frente al UDP-glucosa, que era la diferencia más importante entre las propiedades de las enzimas solubles y las adsorbidas al gránulo (tabla III).

Esto indicaría que la almidón-sintetasa existiría bajo formas moleculares distintas. Un estudio realizado con poliglucosil sintetasas de algas ([29]) permitió detectar varias isoenzimas; lo que parece coincidir con lo conclusión mencionada.

Por la acción de urea concentrada (7M o más) sobre los gránulos de almidón papa éstos se hinchan, y por lavado posterior podía observarse la pérdida de la amilosa que se separaba de las envol-

TABLA III

Efecto de la rotura mecánica sobre la especificidad del complejo almidón-enzima

Gránulos de choclo dulce	Incorporación a partir de	
	ADP-glucosa %	UDP-glucosa %
Intactos	68	20,1
Rotos mecánicamente	58	0,

turas del gránulo, formadas por amilopectina ([23]). Estas envolturas contenían aún toda la actividad enzimática ([16]) indicando que la enzima se encontraba unida a la envoltura del gránulo.

d) Fosforilasas

Las almidón-sintetasas necesitan para su acción la presencia de un aceptor ramificado ya que su acción sobre moléculas lineales largas era relativamente pobre ([30, 16]). Tampoco se habían detectado *in vivo* oligosacáridos o polisacáridos que pudieran considerarse precursores del almidón. En 1967 se pudo obtener por preincubación del tubérculo de papa con glucosa-1P la formación intracelular de un polisacárido del tipo de la amilopectina que una vez aislado y purificado resultó ser un excelente aceptor para la almidón-sintetasa soluble ([31]). La formación de este polisacárido *in vivo* no se debía a la inducción o activación de las fosforilasas o almidón sintetasas solubles. Posteriormente ([32]) se aisló un nuevo tipo de fosforilasa de extractos de papa que era capaz de formar con el sólo agregado de GIP y sin requerir la presencia de un aceptor, un polisacárido del tipo de la amilosa o de la amilopectina. Esta fosforilasa se diferenciaba de las fosforilasas que requerían un aceptor por una serie de propiedades (tabla IV).

El fosfato inorgánico, en una concentración igual al doble de la GIP no afectaba la formación del polisacárido catalizado por esta nueva enzima. Era una enzima sumamente lábil y su actividad aparecía en las sucesivas etapas de purificación acompañada por las actividades de la fosforilasa que requería un aceptor y por la enzima Q, obteniéndose por consiguiente un polisacárido ramificado.

TABLA IV

Propiedades comparativas entre las fosforilasas que requieren y no requieren un aceptor

Tratamiento	Actividad μmoles de P_i liberado	
	Sin agregado de aceptor	Con agregado de amilosa
—	0,45	0,45
Calentamiento a 55° durante 5 min.	0,02	0,40
7 días a — 15°	0,05	0,36

Inhibiendo con ATP y Mg^{++} a la enzima ramificante, o separándola durante la purificación, se obtenía un polisacárido del tipo de la amilosa (tabla V).

TABLA V

Efecto de inhibidores sobre la ramificación del polisacárido formado por la fosforilasa

Tratamiento	Agregado	Polisacárido formado Tipo amilosa	Actividad de la Q enzima Tipo amilopectina	OD 650
Enzima precipitada entre 0-40 °/₀ de sulfato de amonio (SA40)....	—	—	0,53	0,28
	ATP	0,60	—	0,10
	Mg^{2+}	0,61	—	0,01
Sobrenadante........	—	0,30	—	0,01

El efecto inhibitorio sobre la enzima ramificante debido al ATP y al Mg^{++} podría tener importancia fisiológica ya que pueden estar involucrados en la regulación de la proporción amilosa-amilopectina que se forma en la célula.

La hipótesis de la participación de una fosforilasa en la primera etapa de la biosíntesis del almidón ([33-35]) vuelve a adquirir actualidad con el hallazgo de esta nueva fosforilasa.

En cambinación regulada con la enzima ramificante podría dar origen a un excelente aceptor para la almidón-sintetasa. Al formarse la amilopectina, la almidón-sintetasa quedaría incluida en la misma, dando origen así a la almidón-sintetasa unida al gránulo de almidón.

CONCLUSION

Nuestros conocimientos acerca de las enzimas que pueden intervenir en la biosíntesis del almidón se han incrementado mucho en la última década. Pero muchos problemas, especialmente los relacionados con la formación del gránulo *in vivo*, quedan aún en pie. Nuestros conocimientos acerca de la naturaleza y la función del amiloplasto son aún muy limitados. Queda por examinar aún el rol de las enzimas que pueden afectar indirectamente la biosíntesis del almidón; v. g. la ADP-glucosa pirofosforilasa cuya regulación se produce por ciertos compuestos que se forman de la fotosíntesis ([36]),

o la sacarosa sintetasa (37). Ambas enzimas están involucradas en la formación de nucleótidos azúcar y podrían aportar nueva información al problema de la formación del gránulo. La concentración *in vivo* de glucosa-1-fosfato y la regulación de su síntesis también pueden influir en la biosíntesis del gránulo de almidón. Otros compuestos de carácter lipídico, como los derivados glucosídicos del isopreno (38, 39) o de los esteroides (40) pueden desempeñar también un rol en la formación del gránulo de almidón.

Los trabajos pioneros de Leloir sobre el rol de los nucleótidos azúcares en la biosíntesis del almidón abrieron una nueva etapa en este tema, pero muchos problemas importantes del mismo aguardan aún su solución.

BIBLIOGRAFIA

1. Meyer, K. H., Tech. Ind. Schweiz. Chem. Ztg., *25*, 37 (1942).
2. Stepanenko, B. N. y Afanaseva, E. M., Biochem. (U.R.S.S.), *22*, 285 (1957).
3. Geddes, R., Greenwood, C. T., McGregor, A. W., Proctor, A. R. y Thompson, J., Makromol., Chem., *79*, 189 (1964).
4. Haworth, W. N., Peat, S. y Bourne, E. J., Nature, *154*, 236 (1944).
5. Hanes, C. S., Nature, *145*, 348 (1940).
6. Cori, G. T., Colowick, S. P. y Cori, C. F., J. Biol. Chem., *123*, 375 (1938).
7. Cori, C. F. en Gaebler, O. H. (Ed.), *Units of Biological Structure and Function*, Academic Press, New York, 573 (1956).
8. Helmerich, E., Compr. Biochem., 17 (1969).
9. Leloir, L. F., Proceeding of the VIth Pan American Congress of Endocrinology, Mexico City, 65 (1965).
10. Ewart, M. H., Simonovitch, D. y Briggs, D. R., Plant Physiol., *29*, 407 (1954).
11. Abdullah, M. y Whelan, W. J., Biochem. J., *75*, 12 P (1965).
12. Peat, S., Whelan, W. J. y Kroll, G. W. F., J. Chem. Soc., *53*, (1956).
13. Fekete, M. A. R. de, Leloir, L. F. y Cardini, C. E., Nature, *187*, 918 (1960).
14. Leloir, L. F., Fekete, M. A. R. de y Cardini, C. E., J. Biol. Chem., *236*, 636 (1961).
15. Recondo, G. y Leloir, L. F., Biochem. Biophys. Res. Commun., *102*, 242 (1963).
16. Frydman, R. B. y Cardini, C. E., J. Biol. Chem., *242*, 312 (1967).
17. Judewicz, N., Lavintman, N. y Cardini, C. E., VI Reunión de la S.A.I.B., La Plata (1970).
18. Katsuka, T. A. y Nelson, O. E., J. Biol. Chem., *241*, 2280 (1966).
19. Murata, T. y Akazawa, T., Arch. Biochem. and Biophys., *126*, 873 (1968).
20. Frydman, R. B. y Cardini, C. E., Biochim. Biophys. Acta, *96*, 294 (1965).
21. — Biochem. Biophys. Res. Commun., *17*, 407 (1964).
22. Doi, A., Doi, K. y Nikuni, Z., Biochim. Biophys. Acta, *92*, 628 (1964).
23. Ghosh, H. P. y Preiss, J., Biochem., *4*, 1354 (1965).

24. Murata, T., Sugiyama, T. y Akazawa, T., Biochim. Biophys. Res. Commun., *18*, 371 (1965).
25. Lavintman, N. y Cardini, C. E., Plant and Cell Physiol. *9*, 587 (1968).
26. Frydman, R. B., de Souza, B. C. y Cardini, C. E., Biochim. Biophys. Acta, *113*, 620 (1966).
27. Yin, H. C. y Sun, C. N., Science, *105*, 650 (1947).
28. Frydman, R. R. y Cardini, C. E., Arch. Biochem. Biophys., *116*, 9 (1966).
29. Fredrick, J. F., Ann. N. Y. Acad. Sci., *175*, 524 (1970).
30. Doi, A., Doi, K. y Nikuni, Z., Biochim. Biophys. Acta, *113*, 312 (1966).
31. Frydman, R. B. y Cardini, C. E., Plant Physiol., *42*, 628 (1967).
32. Slabnik, E. y Frydman, R. B., Biochim. Biophys. Res. Commun., *38*, 709 (1970).
33. Porter, H. K., Ann. Rev. Plant Physiol., *13*, 303 (1962).
34. Badenhuizen, N. P. y Chandor, K. R., Rev. Cereal Chem., *42*, 44 (1965).
35. Fekete, M. A. R. de, Planta., *79*, 208 (1968).
36. Preiss, J. y Kosuge, T., Ann. Rev. Plant Physiol., *21*, 433 (1970).
37. Fekete, M. A. R. de y Cardini, C. E., Arch. Biochim. Biophys., *104*, 173 (1964).
38. Wright, A., Dankert, M., Fennesey, P. y Robbins, P. W., Proc. Nat. Acad. of Sci., *57*, 1798 (1967).
39. Behrens, N. H. y Leloir, L. F., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., *66*, 153 (1970).
40. Lavintman, N. y Cardini, C. E., Biochim. Biophys. Acta, *201*, 508 (1970).

ENZIMAS RAMIFICANTES VEGETALES

Por NELLY LAVINTMAN

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, « Fundación Campomar »
y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

RESUMEN

En tejidos vegetales se había descrito la presencia de enzimas ramificantes, llamadas Q-enzimas, capaces de actuar sobre la amilosa, dando lugar a la formación de un polisacárido del tipo de la amilopectina. Las Q-enzimas no tenían acción sobre la amilopectina. En endosperma de semillas de maíz dulce se descubrió la existencia de un sistema enzimático que actuaba tanto sobre la amilosa como sobre la amilopectina, dando como producto final un polisacárido similar al fitoglucógeno. Se estudiaron las propiedades de ese sistema y su mecanismo de acción.

Una característica única de los vegetales es la elevada proporción y la gran variedad de los polisacáridos que entran en su composición. Estos polisacáridos cumplen funciones muy variadas y esenciales como constituyentes estructurales o como sustancias de reserva.

Cada una de estas múltiples funciones está asociada a una estructura química especial. Esta variedad de compuestos se logra por modificaciones relativamente pequeñas de una estructura básica constituida por unidades de monosacáridos, derivados todos de la glucosa y polimerizados a través de uniones glucosídicas. Una de las modificaciones que produce cambios más notables es la introducción de ramificaciones en polímeros lineales. Así, cadenas lineales como las de la amilosa, solubles, capaces de asociación lateral con formación de productos insolubles, cristalinos y relativamente anhidros, se transforman por ramificación en moléculas amorfas, fuertemente hidrofílicas que en medio acuoso se encuentran al

estado de geles, como ocurre con la amilopectina. Propiedades similares se obtienen en el caso de los heteropolisacáridos, como las gomas y las pectinas, constituyentes típicos de las paredes celulares y de los espacios intercelulares. En todos los casos la disposición de las cadenas laterales parece estar asociada a la función especial que cumple el polisacárido dentro del tejido vegetal.

A pesar de la gran variedad de polisacáridos ramificados que existen en las plantas sólo se conoce con cierto detalle el mecanismo de ramificación que lleva a la formación de amilopectina, constituyente del grano de almidón.

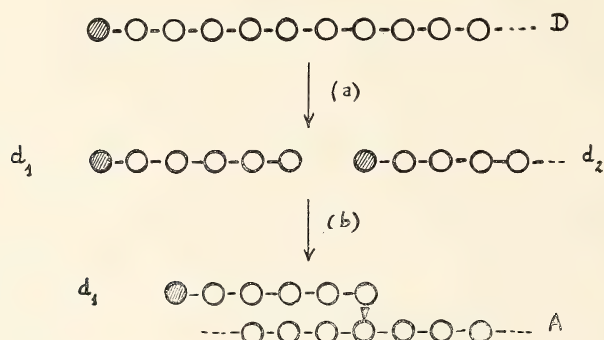


Fig. 1. — Formación de una unión glucosídica α-1,6 por una enzima ramificante. Símbolos: ○, residuo de glucosa; ●, extremo no reductor; —, unión α-1,4; ▶, unión α-1,6.

Haworth y colab. (1) en el año 1944 demostraron en el jugo de papa la presencia de una enzima, que junto a la fosforilasa (enzima-P) y un aceptor adecuado, formaba un polisacárido similar en su estructura química a la amilopectina natural. La denominó enzima-Q y su presencia fue luego confirmada en otros vegetales (2, 3, 4) y en un organismo unicelular, la Politomella coeca (5).

Los trabajos de Peat y colab. (6), de Nussenbaum y Hassid (7), de Barker (8), de Larner (9) y otros han permitido llegar a un esquema de su mecanismo de acción.

La figura 1 esquematiza la acción de una enzima ramificante sobre una sección lineal de residuos de glucosa unidas en α-1,4 que comprende: *a*) la ruptura de una unión α-1,4 no terminal, *b*) la unión del extremo libre de la cadena corta liberada por medio de una ligadura α-1,6. Esta acción puede ser considerada como una transglucosilación en la cual una cadena de residuos de glucosa (d_1)

es transferida desde un sustrato dador (D) a un aceptor (A). Este aceptor puede ser otra cadena o la parte remanente de la cadena original del dador (d_2).

La enzima Q (α-1,4-glucán: α-1,4-glucan-6 glucosiltransferasa) actúa sobre cadenas lineales del tipo de la amilosa, cuando han alcanzado un cierto largo del orden de 100 unidades de glucosa. La enzima separa un trozo de la cadena del extremo no reductor y lo transfiere ya sea al resto de la cadena u a otra cadena, creando una ramificación sobre el hidroxilo en posición 6 de una glucosa. No está aclarado si la cadena aceptora es la misma o distinta de la que cede la rama, pero los trabajos sobre la enzima de la Politomella ([10]) parecen señalar que es otra cadena. Esto haría más explicable el proceso dado que podrían juntarse en la enzima la cadena dadora y la aceptora. Se ha demostrado también que las cadenas exteriores de la amilopectina, cuando han alcanzado cierto largo (13-14 unidades) pueden ser sustratos de la enzima ([9]).

En esta forma el esquema general de síntesis de la amilopectina sería el siguiente: a partir de un primer aceptor todavía desconocido se adicionan unidades de glucosa en unión alfa-1,4 por la enzima almidón sintetasa y el UDP-glucosa o ADP-glucosa ([11, 12]). Cuando esta unidades llegan a un cierto largo, comienza el proceso de ramificación.

El polisacárido ramificado que se va formando va alargando sus cadenas externas, que a su vez vuelven a ramificarse. Las ramificaciones no se colocan al azar, sino que su distribución es específica para cada tipo de amilopectina, de un orden de una unión alfa-1,6 por cada veinte alfa-1,4 dando un porcentaje de ramificaciones del 4,5 % para la de papa. La enzima ya no actúa sobre esta amilopectina así formada, salvo se le alarguen las cadenas y se repita el proceso hasta un límite que no ha sido estudiado. La detención de la ramificación se debe a la especificidad de la enzima, ya que termodinámicamente está muy favorecida la reacción de ramificación porque la unión alfa-1,6 es más estable y el ΔF° de transferencia de 1,4 a 1,6 es del orden de -700 a -1300 calorías. Se ha calculado que si el intercambio entre ambas formas de unión fuera libremente reversible, la mezcla en equilibrio tendría 70-90 % de uniones alfa-1,6 ([13]). No existe, por otra parte un impedimento espacial, dado que hay productos más densamente ramificados como el glucógeno (9 % de ramificaciones).

Todos los resultados mencionados han sido obtenidos "in vitro", con sustratos solubles. En realidad la amilopectina natural no está en este estado. Tratando el grano de almidón con reactivos muy suaves, como la urea, se separa toda la amilosa y queda el glóbulo de amilopectina, de estructura similar al grano primitivo, pero enormemente hidratado y de un tamaño muchas veces mayor al grano natural. Es posible calcular que si este p roceso ocurriera en las células y sólo algunos granos se hincharan, la estructura celular sería destruida. Esto no ocurre ni siquiera durante la degradación del grano. De allí que uno de los varios problemas que deben resolver se es cómo se construye esta macromolécula, que da la forma característica de cada grano y cómo una molécula tan hidrofílica se forma y existe en estado anhidro e insoluble, mantenida así por la especial estructura del grano de almidón, que le permite cumplir su función de almacenamiento casi ilimitado de azúcares.

ENZIMAS RAMIFICANTES DE MAIZ DULCE

Todas las enzimas-Q estudiadas coinciden en un aspecto fundamental: no tienen acción sobre la amilopectina ([14]).

Existe un caso hasta ahora único en plantas, que es el de las semillas de ciertas variedades de maíz. El endosperma se semillas de maíz dulce (Zea mays, var. Saccharatum) se caracteriza por contener, además de almidón, un polisacárido soluble en agua, el *fitoglucógeno*, cuya estructura es muy similar a la del glucógeno animal ([15]). Todas las características físicas del fitoglucógeno, tales como solubilidad, espectro con iodo y centrifugación son también similares a las del glucógeno animal y presenta un aspecto particulado cuando se observa al microscopio electrónico (fig. 2). Por otra parte, es interesante destacar que el grado de ramificación de la amilopectina contenida en los granos de almidón de estas variedades de maíz es intermedio entre el del glucógeno y el de la amilopectina de papa ([17]).

Esta coexistencia de un polisacárido típico vegetal, la amilopectina, que se encuentra al estado insoluble y de otro típico animal con una forma de molécula distinta, más ramificado, soluble y sedimentable a altas velocidades, llevó a estudiar la posibilidad de la existencia de enzimas ramificantes distintas a las de otros vegetales.

Los estudios realizados permitieron descubrir un sistema enzimático que actuaba sobre amilosa y amilopectina dando lugar a la formación de un polisácarido similar al fitoglucógeno ([18, 19]). Por primera vez se describía una enzima vegetal ramificante capaz de actuar sobre amilopectina (tabla I).

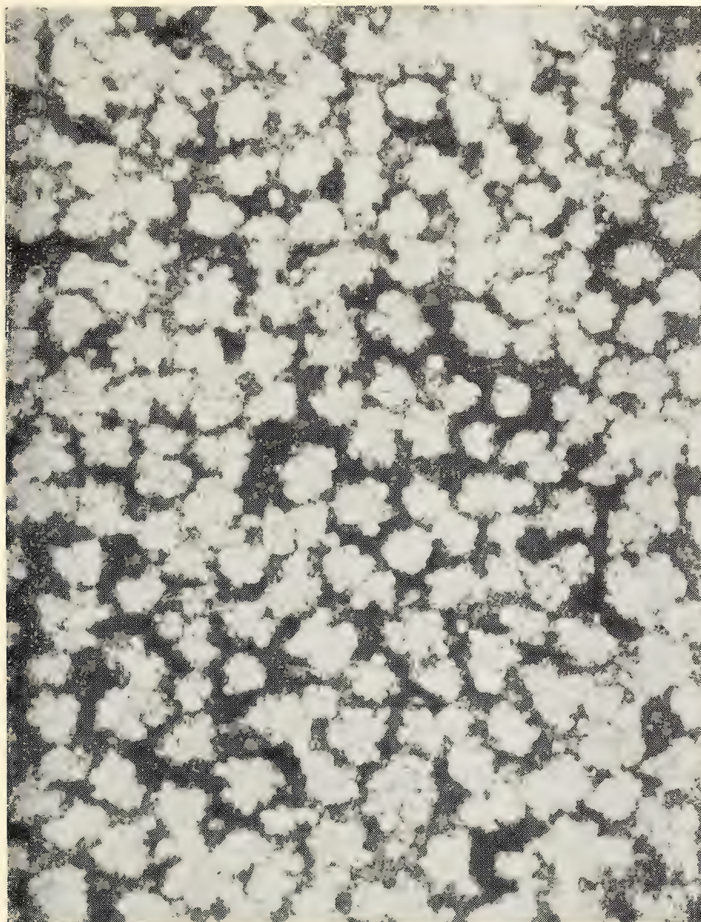


Fig. 2. — Microfotografía electrónica de fitoglucógeno aislado de endosperma de maíz dulce ; 120,000 ×. (Lavintman N., 1966

Se estudiaron las propiedades de ese sistema enzimático de maíz dulce, usando amilosa o amilopectina como sustratos ([16]). Sobre las bases del comportamiento diferente observado con cada uno de ellos, como ser pH óptimo, activación por citrato, efecto de

TABLA I

Efecto de la enzima ramificante de maíz dulce sobre amilosa y amilopectina. [18]

La mezcla de reacción contiene 1 mg de amilosa o amilopectina, 80 μl de preparación enzimática (0.026 mg de proteína) y buffer citrato 0,2 M a pH 6.3 en un volumen final de 0.1 ml. Los controles se preparan de la misma manera, agregando la enzima al final de la incubación. Se incuba durante una noche a 30° bajo vapores de tolueno y se agregan 2 volúmenes de metanol. El precipitado obtenido por centrifugación a 2000 rev/min se lava dos veces con metanol-H_2O y se redisuelve en 0.5 ml de H_2O. Se toman alícuotas de 0.1 ml para determinar el espectro de absorción en presencia de reactivo de iodo [22] y el límite de beta-amilolisis.

Polisacárido	λmáx (mμ)	β-amilolisis °/₀
Amilosa (control)	640	90
Amilosa + enz. ramificante	480	40
Amilopectina (control)	520	46
Amilopectina + enz. ramificante	470	39
Fitoglucógeno	460	38

Hg^{++} y de temperatura, pudo concluirse que la preparación contenía dos actividades ramificantes distintas: la enzima que actuaba sobre la amilosa no atacaba amilopectina y ésta era ramificada por una segunda enzima. Analizando las características de los polisacáridos obtenidos por acción de la preparación enzimática sobre amilosa, pudo observarse que, en condiciones experimentales apropiadas se podía aislar un producto intermediario del tipo de la amilopectina. La incubación de este último con nuevas cantidades de enzima daba un producto final de propiedades semejantes a las del fitoglucógeno (tabla II).

Como el almidón y el fitoglucógeno están presentes en el endosperma era acertado suponer que la actividad sobre amilosa era similar o idéntica a la de la enzima-Q que lleva a la formación de la amilopectina "in vivo", mientras que la de amilopectina era responsable de la formación de fitoglucógeno en los glóbulos citoplasmáticos (16).

En los genotipos que no contienen fitoglucógeno, tales como el maíz común, trigo o cebada no se encontró la enzima ramificante que actúa sobre amilopectina (16), confirmándose la existencia de un mecanismo genético que controla las enzimas involucradas en la síntesis de polisacáridos de reserva (20).

TABLA II

Aislamiento de polisacáridos obtenidos por acción de la enzima ramificante de maíz dulce sobre amilosa. ([16])

Se incuba 7 mg de amilosa a 37°, durante una noche, bajo vapores de tolueno, con 0.004 mg de enzima ramificante de maíz dulce en buffer citrato 0,25 M, pH 6.4, en un volumen de 2.5 ml. Se para la reacción calentando 3 minutos a 100° ; se agregan 7 ml de metanol y se centrifuga. El precipitado obtenido se lava 3 veces con metanol-H_2O (1 : 3) y se redisuelve en 6 ml de H_2O (I). Se incuban 20 μl de (I) a 37° durante 1 hora, con 0.02 mg de enzima en buffer citrato 0.2 M. pH 6.4 en un volumen final de 0.1 ml. Se toman alícuotas apropiadas de (I) para determinar el espectro de absorción en presencia de reactivo de iodo ([22]), el porcentaje de beta-amilolisis y el largo promedio de cadena por el método del periodato.

	λmáx (mM)	β-amilolisis %	largos de cadena promedio (periodato)	Grado de ramificación %
Amilosa de papa.....	640	100	—	—
Amilopectina de papa	520	64	22	4,4
Amilosa + enzima (I)	540	70	23	4,1
(I) + enzima........	460	—	—	—

Las enzimas ramificantes de maíz, dulce al igual que la de hígado, pueden actuar sobre amilosas con cadenas de un largo promedio de 22 a 220 unidades de glucosa y sobre dextrina betalímite de amilopectina, indicando una similitud de especificidad de sustrato con la enzima de origen animal ([16, 22]).

Manners y Rowe intentaron separar las actividades ramificantes de maíz dulce sobre amilosa y sobre amilopectina, logrando aislar una fracción con actividad de enzima-Q y otra con acción sobre los dos polisacáridos ([21]).

Quedan varios problemas por resolver:

¿Cuál sería el mecanismo de biosíntesis del fitoglucógeno? Podemos imaginar un proceso semejante al de la amilopectina, partiendo de un primer aceptor, que se alargaría con la sintetasa específica hasta alcanzar el largo de cadena requerido para la acción de esta nueva enzima ramificante de maíz dulce, con una especificidad tal que lleva a la formación de ramas más cortas y una ramificación más densa.

Otra posibilidad es que una vez formada la amilopectina, ésta se transforme en fitoglucógeno por un mecanismo de ramificación que implique la transferencia de restos de cadenas ya ramificadas.

Esta alternativa estaría apoyada por dos hechos experimentales: la acción de la enzima sobre la dextrina betalímite de amilopectina y la obtención de un polisacárido del tipo de la amilopectina como producto intermediario entre la amilosa y el fitoglucógeno ([16]). Sería muy interesante determinar cuál es la relación entre el metabolismo del almidón y del fitoglucógeno y su implicancia fisiológica.

Erlander ha emitido una teoría al respecto, que aún no ha sido comprobada experimentalmente, en la que considera al fitoglucógeno como precursor de la amilopectina ([23]).

BIBLIOGRAFIA

1. Haworth, W. N., Peat, S. y Bourne, E. J., Nature, *154*, 236 (1944).
2. Cori, G. T., Swanson, M. A. y Cori, C. F., Federation Proc., *4*, 234 (1945).
3. Hobson, P. N., Whelan, W. J. y Peat, S., J. Chem. Soc., 3566 (1950).
4. Hehre, E. J., Carlson, A. S. y Neill, J. M., Science, *106*, 523 (1947).
5. Bebbington, A., Bourne, E. J. y Wilkinson, I. A., J. Chem. Soc., 246 (1952).
6. Peat, S., Whelan, W. J. y Bailey, J. M., J. Chem. Soc., 1422 (1953).
7. Nussembaum, S. y Hassid, W. Z., J. Biol. Chem., *196*, 785 (1952).
8. Barker, S. A., Bebbington, A. y Bourne, E. J., Nature, *168*, 834 (1951).
9. Larner, J., J. Biol. Chem., *202*, 491 (1953).
10. Barker, S. A., Bebbington, A. y Bourne, E. J., J. Chem. Soc., 4051 (1953).
11. Leloir, L. F., Fekete, M. A. R. de y Cardini, C. E., J. Biol. Chem., *236*, 636 (1961).
12. Frydman, R. B. y Cardini, C. E., Biochim. Biophys. Acta, *96*, 294 (1965).
13. French, D., *Control of glycogen metabolism*. Ciba Foundation Symposium, p. 20 (1964).
14. Peat, S., Turvey, J. R. y Jones, G., J. Chem. Soc., 1540 (1959).
15. Peat, S., Whelan, W. J. y Turvey, J. R., J. Chem. Soc., 2317 (1956).
16. Lavintman, N., Arch. Biochem. Biophys., *116*, 1 (1966).
17. Dvonch, W., Kramer, H. H. y Whistler, R. L., Cereal Chem., *28*, 270 (1951).
18. Lavintman, N. y Krisman, C. R., Biochim. Biophys. Acta, *89*, 193 (1964).
19. Manners, D. J. y Rowe, J. J. M., Chem. & Ind., 1834 (1964).
20. Cameron, J. W., Genetics, *32*, 459 (1947).
21. Manners, D. J., Rowe, J. J. M. y Rowe, K. L., Carbohyd. Res., *8*, 72 (1968).
22. Krisman, C. R., Biochim. Biophys. Acta, *65*, 307 (1962).
23. Erlander, S. R. y Griffin, H. L., Starke, *19*, 34 (1967).

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN «EUGLENA GRACILIS»

Por LUIS RAMON MARECHAL y ENRIQUE BELOCOPITOW

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, « Fundación Campomar »
y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

RESUMEN

En este trabajo se ha incluido una introducción en la que se ubica a la *Euglena* como especie, luego se presentan aspectos del metabolismo de los hidratos de carbono, haciendo especial hincapié en las enzimas encontradas en este laboratorio como : la paramilon sintetasa, la laminaribiosa fosforilasa, la β 1-3 oligoglucanfosforilasa, la paramilon fosforilasa, la trehalosa fosforilasa y la fosfoglucomutasa para β glucosa 1 P.

Los Euglenoides son organismos fitoflagelados unicelulares (Protistas) cuya clasificación taxonómica es aún tema de discusión entre los zoólogos y botánicos. Aquellos los definen como animales fotosintetizadores (Euglenodina, Clase Flagellate, filum Protozoa) y los botánicos como plantas nadadoras (filum Euglenofita).

Las características que en algunos aspectos hacen a la Euglena semejante a un animal (aparato locomotor) y por otros semejantes a un vegetal (provisto de cloroplastos), indican que estamos ante una especie taxonómicamente muy interesante. Estos caracteres ambiguos, tienen su confirmación desde el punto de vista metabólico en los trabajos de Bloch, quien observó, que los ácidos grasos de Euglenas crecidas en la luz (Euglenas que forman clorofila), tienen las características de ácidos grasos de vegetales y cuando lo hacen en la oscuridad (no forman cloroplastos) los tienen semejantes a los de origen animal.

Pueden ser autotróficas o heterotróficcas. En la oscuridad se reprime la formación del cloroplasto, lo que la hace interesante para estudios de fotosíntesis y de biosíntesis de proteínas.

El hecho que la mitad de su peso pueda ser carbohidrato, la hace sumamente útil para investigar el metabolismo glucídico.

Este trabajo incluye, dentro de un contexto de puesta al día de este metabolismo hidrocarbonado, los realizados sobre el tema en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

Paramilon

Este sacárido está presente en forma de gránulos en el citoplasma de todos los miembros, fotosintéticos o no, de las Euglenaceas. Su forma, tamaño y disposición en el citoplasma celular es muy variable dependiendo del grupo euglenoide. Se han descripto gránulos globulares, elipsoidales, cilíndricos, lenticulares, discoidales, etc., con tamaño desde 2 micrones de diámetro hasta algunos con 15 micrones de largo por 7 micrones de ancho y 3 de espesor, como en el caso de los dos gránulos típicos de la *Euglena spirogyra.* Los hay dispersos en el citoplasma, sin asociación a ninguna estructura celular; asociados al retículo endoplásmico; o bien próximos al cloroplasto ([1-3]).

La primera descripción del paramilon data de aproximadamente dos siglos ([3]) pero fue Gottlieb en 1850 ([4]) quien demostró que se trataba de un carbohidrato y aunque isómero del almidón no podía teñirse con iodo; de allí su nombre. Posteriormente otros investigadores demostraron que el paramilon estaba constituido principalmente por glucosa, si bien se desconocía la estructura íntima del mismo. En 1952 Kreger y Meeuse ([5]) adelantan una estructura glucosil-glucosa del tipo β 1-3, basados en la similitud del diagrama de rayos X de los gránulos de *Euglena viridis* y *Euglena geniculata* con el del hidroglucano de levadura. Clarke y Stone en 1960 ([6]) realizaron un análisis exhaustivo de los gránulos purificados de paramilon de *Euglena gracilis.* Por hidrólisis total con ácido fórmico primero y con SO_4H_2 3 N después, observaron un solo monosacárido que identificaron como glucosa. La hidrólisis parcial con ácido fórmico dio lugar a una serie de compuestos que identificaron, por su movilidad cromatográfica y por las propiedades de sus derivados cristalinos como la serie de homólogos β 1-3 oligoglucósidos: laminaribiosa, laminaritriosa, -tetraosa, -pentaosa y -hexaosa.

El paramilon es resistente a la oxidación con periodato y a la tinción con los reactivos periodato-Schiff, tetraacetato de Plomo-

Schiff. Esta falta de reactividad está de acuerdo con la estructura asignada β 1-3, pues es la única que no deja libre dos hidroxilos vecinos necesarios para la oxidación con los reactivos mencionados.

Los gránulos nativos de paramilon son completamente insolubles en agua fría y caliente o solventes orgánicos. Se disuelven en álcali diluido (HONa o HOK) y en ácidos minerales concentrados; son también buenos solventes el formaldehido y el ácido fórmico concentrado. Cuando el álcali se neutraliza (paramilon-KOH) o el ácido fórmico se elimina por destilación a baja temperatura, la solución de paramilon se transforma en un gel sin que haya aparentemente hidrólisis.

Los resultados de los análisis por metilación del polisacárido de *Astasia ocellata* realizados por Manners y colaboradores ([7]) demostraron la naturaleza exclusivamente lineal del paramilon. Este parece ser también el caso de otros paramilones de diferente origen, difiriendo únicamente por el grado de polimerización: 50-55 glucosas en el caso del paramilon de *Astasia ocellata* a más de 150 en el correspondiente al de *Euglena gracilis.*

La conformación lineal de las moléculas de paramilon no se conoce. Sin embargo, los estudios de difracción con rayos X y con luz polarizada dieron resultados muy parecidos a los obtenidos con los β-1-3 xilanos de las paredes de cierto tipo de algas verdes (sifonáceas) ([8]), lo cual podría indicar una estructura helicoidal similar a la amilosa y de otros α 1-4 glucanos. Estas estructuras helicoidales se agregarían en micelas para empaquetarse dentro del gránulo ([9]). Resulta interesante destacar que Meeuse ([10]) utilizando microscopio anóptrico ha logrado unas fotografías de gránulos de paramilon provenientes de *E. gracilis* y *Phacus pleuronectes* donde se destaca nítidamente una estructura helicoidal.

Función del paramilon

Desde principios de siglo se han descripto numerosas observaciones sobre la desaparición de los gránulos de paramilon en células de Euglena bajo condiciones de oscuridad o ayuno y su reaparición con la luz o por realimentación, sugiriendo un papel de reserva hidrocarbonada.

Danforth y Wilson ([11]) obtuvieron un cociente respiratorio de 1,0 para la respiración endógena de *Euglena gracilis* var. *bacillaris,* sugiriendo que un carbohidrato, probablemente paramilon, fuera

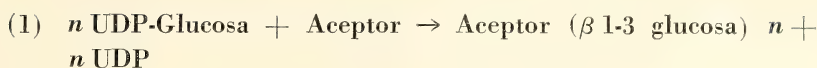
el principal sustrato respiratorio, Marzullo y Danforth ([12]) por su parte, como consecuencia de estudios cinéticos de asimilación del acetato C 14 concluyeron que un compuesto etanol-insoluble identificado como paramilon, constituye la principal reserva metabólica en estos organismos. Tales resultados están apoyados por los de Blum y Buetow ([13]) quienes observaron la desaparición del paramilon después de transferir células de una cepa etiolada de *E. gracilis* var. *bacillaris* desde un medio con acetato como fuente de carbono a otro de ayuno. Después de 4-5 días el contenido de paramilon decayó a un 50 % del inicial y al cabo de 13 días en más de un 90 %, con un 90-95 % de células viables.

La naturaleza de reserva está también indicada por los estudios de Cook ([14]) quien observó que los gránulos de paramilon se acumulan únicamente cuando la energía luminosa suministrada excede las necesidades de la célula. La utilización del paramilon para realizar los procesos necesarios en la división celular se demostró ([15]) en una cepa autotrófica de *E. gracilis,* en cultivo sincronizado por períodos de luz y oscuridad. Durante la fase luminosa, la energía fue suficiente para satisfacer todos los requerimientos para el crecimiento basal y en suficiente exceso para acumular el polisacárido. Sin embargo, el período luminoso no fue de suficiente duración como para permitir la síntesis completa de proteínas y del RNA necesarios para la división celular. En el período oscuro que siguió y durante el cual se realizó la división, el paramilon, sintetizado previamente, fue rápida y completamente degradado para satisfacer los requirimientos necesarios para la síntesis de proteínas.

Biosíntesis del paramilon

La participación de los nuclótido-azúcares en la síntesis de diferentes poli- y oligosacáridos se conocen desde mediados de la década del cincuenta ([16-17]).

En 1953 Lynch y Calvin ([18]) en experimentos de fijación de CO2 C-14 en luz y oscuridad con *Euglema gracilis* observaron, entre los compuestos más rápidamente marcados, la presencia en la fracción etanol-soluble, de un compuesto con la movilidad cromatográfica del UDP-Glucosa. En 1963 en este laboratorio se logró obtener con extractos enzimáticos de *Euglena gracilis* cepa *z* la síntesis de un glucano con propiedades similares al paramilon ([19-20]). El sistema utiliza UDP-Glucosa como dador de restos glucosilos en una reacción como la esquematizada en (1) :



(1) n UDP-Glucosa + Aceptor → Aceptor (β 1-3 glucosa) n + n UDP

La síntesis del glucano se pudo seguir ya sea por la incorporación de Glucosa C 14 (utilizando UDP-Glucosa C 14) a un precipitado insoluble en alcohol 66 % o bien por la determinación del UDP liberado.

Por centrifugación fraccionada pudo establecerse que las fracciones mitocondriales y microsomales tienen 20 a 50 veces mayor actividad específica y total que las que corresponden a núcleos paramilon, lisosomas y cloroplastos ([21]). Esta aparente ubicación intracelular de la paramilon sintetasa es poco usual ya que las dos sintetasas más estudiadas de polisacáridos de reserva, de del almidón y del glucógeno, están íntimamente asociadas a los poliglucanos ([22-23]). Por otro lado la escasa actividad específica de la paramilon sintetasa observada en la fracción correspondiente a los cloroplastos permitirían descartar en principio a estas estructuras como posible sitio de síntesis del polisacárido. En este sentido cabe mencionar que se han descripto algunas formas autotróficas de Euglenas, donde el paramilon está íntimamente asociado con el pirenoide de los cloroplastos ([2]) (estructura similar al de los nucleolos en el núcleo) y que desde principios de siglo se considera al pirenoide como el sitio de síntesis del almidón en algunas algas (Spirogyra, Mougeotia, etc.). Los resultados obtenidos en este laboratorio estarían de acuerdo a las observaciones de Malkoff y Buetow ([24]) en células de *Euglena gracilis*. Después de 13 días de ayuno ellos observaron una extrema vacuolización intracelular que desaparece a las horas de agregar acetato al medio. Entre las 23 y 49 horas posteriores los gránulos de paramilon reaparecen en el citoplasma y están estrechamente asociados a las membranas de las cisternas del retículo endosplásmico. Sin embargo, se necesitarán nuevas investigaciones para tratar de aclarar estas contradicciones, que pueden ser más aparentes que reales.

Una observación interesante con la paramilon sintetasa es que no requiere "primer" exógeno para manifestar su actividad, esto es la velocidad de formación del glucano es la misma con y sin paramilon-KOH agregado. Los intentos de destruir un posible "primer" endógeno tratando la preparación con jugo de hepatopáncreas de caracol (que entre otras enzimas posee una potente β 1-3 glucanasa) no hicieron disminuir la actividad de la enzima. Aún más, la incu-

bación simultánea de la sintetasa con UDP-Glucosa C 14 y jugo de caracol produjeron glucosa C-14 libre y UDP en cantidades equimoleculades y casi idénticas a la radioactividad incorporada al glucano (y al UDP liberado) en un experimento control corrido simultáneamente. Aquello indica que el paramilon se degradó a la misma velocidad con que se sintetizó. Tal comportamiento podría explicarse ya sea porque se realiza una síntesis "de novo" del polisacárido o bien porque el "primer" es inatacable por la glucanasa.

Las células de Euglena que acumulan mayores cantidades de paramilon dan también las preparaciones enzimáticas más activas. Las células crecidas en la oscuridad (etioladas) contienen más polisacárido que las crecidas a la luz ([20] y [25]) mostrando también aquellas, mayor contenido en paramilon sintetasa

Degradación del paramilon

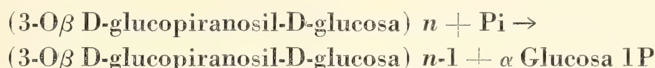
Mencionamos anteriormente que las observaciones morfológicas y las determinaciones cuantitativas del contenido en polisacárido en células de Euglena ([13]) demuestran que después de 13 días de ayunadas el contenido en polisacárido disminuye en más de un 90 %. Esto indica que las células deben contener una sistema para la digestión del polisacárido. Sin embargo, numerosos ensayos realizados en éste y en otros laboratorios fallaron en el sentido de observar *in vitro* una depolimerización de los gránulos de paramilon. Meuse ([26]) informó acerca de un ataque parcial de dichos gránulos con carbohidrasas obtenidas de algunos moluscos de algua dulce (Unio, Dreisenia, Anodonta) conocidos como depredadores naturales de Euglenas. Merrik y Doudoroff ([27]) por su parte han observado que se requiere un mecanismo sumamente complejo para degradar los gránulos nativos del ácido poli-β-hidroxibutírico, la principal sustancia de reserva de muchas bacterias; determinaron también que numerosos agentes físicos y químicos (centrifugación, alcohol, etc.) transforman a dichos gránulos en resistentes a la digestión. No sería por lo tanto de extrañar que una situación semejante aconteciera con el paramilon. Otro ejemplo es el almidón de plantas que cuando nativo resulta resistente al ataque *in vitro* por enzimas hidrolíticas y fosforolíticas.

En la degradación de los polisacáridos de reserva generalmente están implicados por lo menos dos tipos de enzimas: las hidrolíticas y las fosforolíticas.

Fellig [28] logró purificar una laminarasa (β 1-3 glucanasa) presente en extractos de Euglena que libera glucosa (exoglucanasa) de la laminarina (otro glucano β-1-3). En este laboratorio se observó que dicha enzima ataca también al paramilon previamente tratado con álcali y al sintetizado enzimáticamente, pero no actúa sobre el gránulo nativo.

Barras y Stone [29] a su vez examinaron las β 1-3 hidrolasas presentes en una mutante de *E. gracilis* var. *bacillaris* y llegaron a la conclusión que existen de los dos tipos: endo- y exoglucanasas. En este laboratorio hemos observado en extractos de *Euglena gracilis* cepa *z* la presencia de por lo menos tres tipos de fosforilasas. La paramilon fosforilasa [21 y 29], que ha sido muy poco estudiada, es muy inestable formando α glucosa-1-fosfato a partir de paramilon-KOH o laminaria y Pi. Tiene un pH óptimo de alrededor de 7.0 y no actúa sobre los gránulos nativos.

Las otras dos, laminaribiosa- y β 1-3-oligoglucan fosforilasa [30, 31, 32], catalizan reacciones formalmente muy similares ya que actúan sobre β 1-3 glucosiloligosacáridos, de acuerdo a la reacción (2).


(3-Oβ D-glucopiranosil-D-glucosa) n + Pi →
(3-Oβ D-glucopiranosil-D-glucosa) n-1 + α Glucosa 1P

donde n puede valer de 1 a 5, vale decir laminaribiosa, -triosa, etc., hasta laminaridecaosa.

Aun cuando la laminaribiosa- y la β 1-3 oligoglucan fosforilasa catalizan la misma reacción, cada una posee ciertas propiedades particulares que permite diferenciarlas. Así por ejemplo las dos enzimas se pueden separar físicamente por adsorción y elución fraccionada de gel de fosfato de calcio y por cromatografía en DEAE-celulosa Además la β 1-3 oligoglucan fosforilasa, en especial en los extractos envejecidos (2 ó más semanas de preparados), poseen un requerimiento absoluto para grupos-SH (mercaptoetanol, cisteína, glutatión) cosa que no se observó con la laminaribiosa fosforilasa. Un análisis comparativo de las dos fosforilasas puede verse en la tabla 1.

En la tabla I puede verse que la laminaribiosa fosforilasa cataliza la fosforólisis del disacárido con una velocidad cuatro veces ma-

TABLA I

Propiedades de la laminaribiosa y la β 1-3 oligoglucan fosforilasa

	Laminaribiosa fosforilasa	β 1-3 oligoglucan fosforilasa
Especificidad.........	Específicas para α-D-Gluc. 1P ; no actúan el α-D-Gal. 1P, α-D-manosa 1P, Fructosa 6. P, D-Gluc. 6P, β-D-Gluc. 1P. El P*i* puede reemplazarse por As (arsenólisis de los β 1-3 glucosil oligosacáridos) Glucosa puede reemplazarse por varios β glucósidos: celobiosa, genciobiosa, salicina, arbutina, laminaridextrinas, etc. No actúan sobre paramilon nativo, ni paramilon-KOH, ni laminarina.	
Km.		
Glucosa..............	19 mM	40 mM
Laminaribiosa........	5 »	4 »
Laminaritriosa........	—	4,5 »
Laminaritetraosa	—	3 »
Laminaripentaosa.....	—	2 »
pH óptimo............	6,3-6,9	7,0-7,4
Requerimientos	ninguno	grupos -SH
Inhibidores		
Glucosa..............	por encima de 0,1 M	no inhibe
p-mercuribenzoato.....	80 % a 2 mM	70 % a 7 micromolar 100 % 70 »
Fosforólisis de :	(en milicromoles de α Gluc. 1P/min)	
Laminaribiosa........	17,0	2
Laminaritriosa........	4,6	8
Laminaritetraosa	4,4	8
Laminaripentaosa.....	3,4	8
Laminariheptaosa.....	0,5	2,6
Paramilón, laminarina.	0,0	0,0

yor que lo que ocurre con los homólogos superiores y que lo contrario ocurre con la β 1-3 oligoclucán fosforilasa (exceptuando la laminariheptaosa).

Por su parte Manners y Taylor (33) observaron en *Astasia ocellata* la presencia de una laminaribiosa fosforilasa con propiedades muy parecidas a las de Euglena.

Cuando se compara los productos formados en el sentido de la síntesis de oligosacáridos, las dos fosforilasas de Euglena pueden situarse en el punto medio de los extremos constituidos por la disacáridos fosforilasas (maltosa- sacarosa y celobiosa-fosforilasa) y por las polisacárido fosforilasas (glucógeno- y almidón fosforilasa). La diferencia consiste en que ninguno de estos dos grupos enzimáticos pueden formar tan fácilmente oligosacáridos superiores a partir de una molécula tan pequeña como la glucosa. Así con este azúcar como aceptor, la laminaribiosa fosforilasa es capaz de catalizar en tiempos no mayores a 30 min la formación de di, tri, tetra y pentasacárido (con la β 1-3 oligoglucán fosforilasa pudo detectarse hasta el heptasacárido). La sacarosa-, la maltosa- y la celobiosa fosforilasa en cambio solo catalizan la formación del disacárido correspondiente ([34]). Por otro lado la molécula más pequeña que sirve de aceptor para la polisacárido forforilasa de plantas es la maltotriosa ([35]). La fosforilasa animal si bien puede catalizar la formación de oligosacáridos superiores a partir de maltosa, el tiempo requerido para ello es mucho mayor ([35]).

En *Euglena gracilis* cepa *z* y en otros Euglenoides se han encontrado la mayor parte, sino todas, las enzimas que de acuerdo a lo aceptado hasta ahora permite transformar a la glucosa (o la glucosa 6P vía gluconeogénesis) en un polisacárido de reserva. El proceso de degradación en cambio, presenta algunas lagunas. Así por ejemplo se desconoce los mecanismos que utilizan estas células para transformar el gránulo de paramilon en un componente metabólicamente apto para ser asimilado. La presencia de por lo menos tres tipos de fosforilasas en Euglena con grados de especificidad aparentemente distintos, permite predecir una cierta complejidad en aquella transformación.

Pese a que aún permanecen muchos problemas por resolver, con los datos obtenidos de éste y otros laboratorios y extrapolando los conocimientos adquiridos sobre la síntesis y degradación de polisacáridos de reserva en bacterias, levaduras, plantas y mamíferos, se puede elaborar un esquema tentativo de los procesos que tienen lugar en la célula de Euglena para la formación y depolimerización de su polisacárido de reserva (fig. 1).

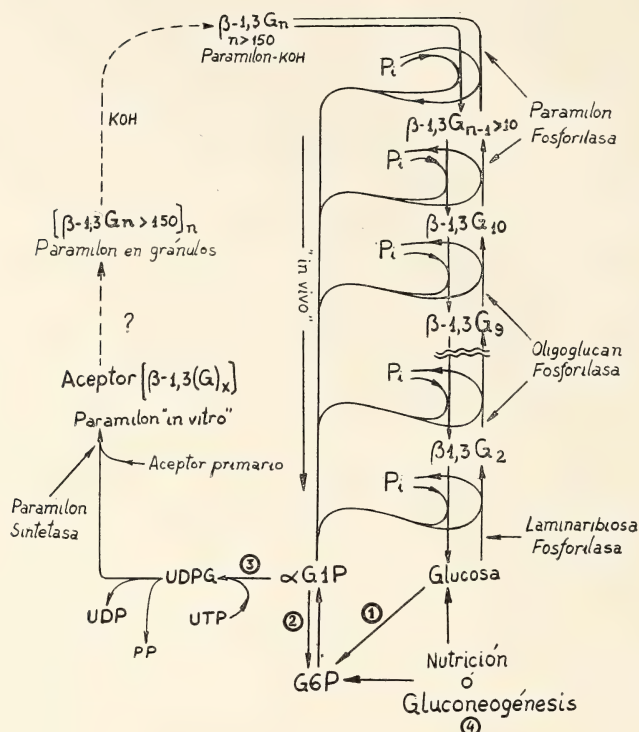


Fig. 1. — Metabolismo de paramilon en *E. gracilis*: 1, Hexoquinasa (21 ; 41) 2, Fosfoglucomutasa (21 ; 42) ; 3, UDP-Glucosa pirofosforilasa (21 ; 42) ; 4 (9)

Metabolismo de la trehalosa

La primera observación de que el UDP-Glucosa puede ser utilizado en la síntesis enzimática de azúcares fue realizada por Cabib y Leloir en 1952 ([36]). Con extractos de levadura, UDP-Glucosa y Glucosa 6P sintetizaron un compuesto que fue identificado como trehalosa 6P; ese mismo extracto contenía además una fosfatasa que convirtió a la trehalosa 6P en trehalosa. Trabajos posteriores de otros grupos de investigación demostraron la existencia de una enzima similar a la de levadura en insectos, bacterias, etc. ([37]). La Euglena gracilis no parece escapar a esta generalización ya que en nuestro laboratorio hemos observado la síntesis de un compuesto tentativamente identificado como trehalosa fosfato con UDP-Glucosa y Glucosa 6P.

No ocurre lo mismo con el camino catabólico de este disacárido.

Hasta ahora el único camino conocido de la ruptura de la trehalosa era el catalizado por trehalasas que producen por hidrólisis dos moles de glucosa por mol del disacárido. En extractos libres de células de *Euglena gracilis* var. *bacillaris,* en una mutante etiolada y en la cepa *z* observamos la presencia de una enzima, trehalosa fosforilasa (39), que cataliza el clivaje fosforolítico de la trehalosa, de acuerdo a


Trehalosa + Pi ⇄ β-D-Glucosa 1P + glucosa

En ausencia de sus sustratos Pi o β-Glucosa 1P esta enzima es sumamente inestable; en este sentido el anómero α puede reemplazar al β. Tiene además la enzima la particularidad de poseer dos óptimos diferentes de actividad dependiendo del sentido en que se mida la reacción: pH 6.3 cuando se mide en el sentido de la síntesis de trehalosa y pH 7.0 cuando se lo hace en el sentido de la fosforólisis. El peso molecular aproximado, medido en gradiente de sacarosa es de 347.000.

A diferencia de la ruptura hidrolítica producida por la trehalasa, la actividad de la trehalosa fosforilasa permite una transformación mucho más económica desde el punto de vista energético, ya que la energía de unión glucosídica se transfiere en buena parte a la hexosa fosfato. Hasta el presente sólo se había descripto una única enzima que produce β-Glucosa 1P: la maltosa fosforilasa presente en Neisseria (34). En estos mismos organismos está presente otra enzima, una fosfoglucomutasa para β-Glucosa 1P que lo transforma en Glucosa 6P, permitiendo así la metabolización de aquél por el camino de Embden-Meyerhoff-Parnas (40).

Una proteína de características catalíticas similares hemos observado en *Euglena gracilis.* De este modo ambas actividades enzimáticas, la trehalosa fosforilasa y la fosfoglucomutasa para β-Glucosa 1P se complementan para constituir un nueva camino metabólico para el disacárido. En la figura 2 se esquematizan las diferentes etapas que llevan a la síntesis y degradación de la trehalosa que suponemos operativas en células de Euglena.

El papel que desempeña la trehalosa en los Euglenoides es desconocido. Marzullo y Danforth (39) observaron que en células de Euglena alimentadas con acetato C 14, el 30 % de las cuentas incorporadas en la fracción etanol-soluble corresponde a la trehalosa, pero cuantitativamente piensan que no es suficiente para explicar

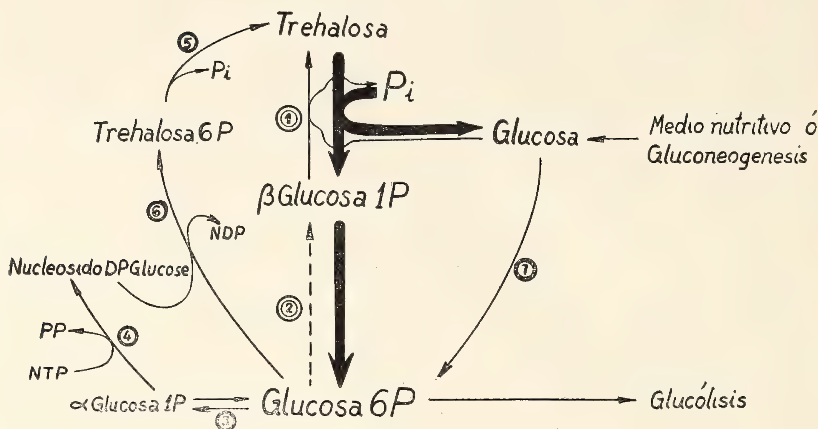


Fig. 2. — Metabolismo de Trehalosa en *E. Gracilis* : 1, trehalosa fosforilasa ; 2, Fosfoglucomatasa para β Glucosa 1 P ; 3, fosfoglucomutasa ; 4, UDP-Glucosa pirofosforilasa ; 5, trehalosa 6 P fosfatasa ; 6, trehalosa 6 P sintetasa ; 7, Hexoquinasa.

lo que ellos denominan "reserva lábil", es decir la porción glicosídica que más rápidamente es utilizada por las células de Euglena.

BIBLIOGRAFIA

1. Ben-Shaul, Y., Schiff, J. A. y Epstein, H. T., Plant Physiology, *39*, 231 1964.
2. Gibbs, S. P., J. Ultrestruct. Res., *4*, 127, 1960.
3. Müller, O. F., *Animacula Infusoria, Fluviatilia et Marina* (O. Fabricus, ed., Citado por Barras, P. R. y Stone, B. A. (ver 9).
4. Gottlieb, J., Ann. Chem. Pharm., *75*, 50, 1850 (citado por Meeuse, B. J. O. (ver 26).
5. Kreger, D. R. y Meeuse. B. J. D., Biochim. Biophys. Acta, *9*, 699, 1952.
6. Clarke, A. E. y Stone, B. A., Biochim. Biophys. Acta, *44*, 161, 1960.
7. Manners, D. J., Ryley, J. F. y Stark, J. R., Biochem. J., *101*, 323, 1966.
8. Frei, E. y Preston, R. D., Proc. Roy. Soc., *160 B*, 293, 1964.
9. Barras, P. R. y Stone, B. A., *The Biology of Euglene*, D. E. Buetow ed. Academic Press N. York and London, Vol. II, pp. 149, 1968.
10. Leedale, G. F., Meeuse, B. J. D. y Pringsheim, E. G., Arch. Mikrobiol., *50*, 68 y 133, 1965.
11. Danforth, W. F. y Wilson, B. W., J. Gen. Microbial., *24*, 95, 1961.
12. Marzullo, G. y Danforth, W. F., J. Gen. Microbial., *34*, 9 y 21, 1963.
13. Blum, J. J. y Buetow, D. E., Exptl. Cell. Res., *29*, 407, 1963.
14. Cook, J. R., J. Protozool., *10*, 436, 1963.
15. Cook, J. R., Plant Physiol., *41*, 821, 1966.
16. Cardini, C. E., Leloir, L. F. y Chiriboge, J., J. Biol. Chem., *214*, 149, 1955.

17. Leloir, L. F. y Cardini, C. E., J. Am. Chem. Soc., *79*, 6340, 1957.
18. Lynch, V. H. y Calvin, M., Ann. N. Y. Acad. Sci., *56*, 890, 1953.
19. Goldemberg, S. H. y Maréchal, L. R., Biochim. Biophys. Acta, *71*, 743, 1963.
20. Maréchal, L. R. y Goldemberg, S. H., J. Biol. Chem., *239*, 3163, 1964.
21. Maréchal, L. R., Tesis, 1969, Universidad de Buenos Aires.
22. Leloir, L. F. y Goldemberg, S. H., J. Biol. Chem., *235*, 919, 1960.
23. Leloir, L. F., Fekete, M. A. R. de y Cardini, C. E., J. Biol. Chem., *226*, 636, 1961.
24. Malkoff, D. B. y Buetow, D. E., Exptl. Cell. Res., *35*, 58, 1964.
25. Wolken, J. J., en *Euglene and Experimental Organism for Bio-Chemical and Biophysical Studies*, Institute of Microbiology (Ed.), Rutgers, The Sta(e University, 1961.
26. Meeuse, B. J. D., en *Physiology and Biochemistry of Algae*, R. A. Lewin (Ed.), Academic Press N. Y. and London, page 289, 1962.
27. Merrick, J. M. y Doudoroff, M., J. Bacterial, *88*, 60, 1964.
28. Fellig, J., Science, *131*, 832, 1960.
29. Belocopitow, E. y Maréchal, L. R., Resultados no publicados.
30. Goldemberg, S. H., Maréchal, L. R. y De Souza, B., J. Biol. Chem., *241*, 45, 1966.
31. Marechal, L. R., Biochim. Biophys. Acta, *146*, 417, 1967.
32. Marechal, L. R., Biochim. Biophys. Acta, *146*, 431, 1967.
33. Manners, D. J. y Taylor, D. C., Arch. Bioch. Biophys., *121*, 443, 1967.
34. Doudoroff, M., en *The Enzymes*, P. D. Boyer, H. Hardy y K. Myrback (Ed.) Vol. 5, Academic Press Inc. N.Y. and London, page 229, 1961.
35. Illingwort4, B., Brown, D. H. y Cori, C. F., en *Control of Glycogen metabolism*, W. J. Whelan y M. P. Cameron (Ed.) Churchill Ltd. London, pg. 107, 1964.
36. Cabib, E. y Leloir, L. F., J. Biol. Chem., *231*, 259, 1958.
37. Birch, G. G., Advan. Carbohydrate Chem., *18*, 201, 1963.
38. Belocopitow, E. y Maréchal, L. R., Biochim. Biophys. Acta, *198*, 151, 1970.
39. Ben. Zvir y Schramm, M., J. Biol. Chem., *236*, 2185, 1961.
40. Marzullo, G. y Danforth, W. F., J. Gen. Microbiol., *55*, 257, 1969.
41. Belzky, M. M. y Schultz, J., J. Protozool., *9*, 195, 1962.
42. Smillie, R. M., Canadian J. Botany, *41*, 123, 1963.

METABOLISMO DEL GLUCOGENO

Por CLARA R. KRISMAN, I. D. ALGRANATI y SARA H. GOLDEMRBEG

RESUMEN

Se mencionan métodos de aislamiento y purificación del glucógeno, describiendo las principales propiedades del polisacárido. Se discute el papel de las distintas enzimas que intervienen en la biosíntesis y degradación del glucógeno, así como también la regulación de su metabolismo en tejidos animales, levaduras, hongos protozoarios y bacterias.

El significado funcional del glucógeno reside en su capacidad de proveer rápidamente glucosa en el momento en que el organismo lo requiere. El mantenimiento de un nivel constante de glucosa en sangre en sumamente importante, particularmente para el sistema nervioso central que depende exclusivamente de la glucosa como fuente de energía. Se calculó que el cerebro humano utiliza aproximadamente 110 gramos por día (1).

En esta revisión nos referimos a las reacciones correspondientes al metabolismo del glucógeno esquematizadas en la figura 1.

AISLAMIENTO, PURIFICACION Y ESTRUCTURA DEL GLUCOGENO

Este homopolisacárido compuesto por unidades de glucosa está ampliamente distribuido en la naturaleza. Se lo encuentra en hígado, cerebro, riñón, músculo cardíaco y esquelético de mamíferos, en tejidos de invertebrados, en bacterias, levaduras, hongos, protozoarios. Es interesante destacar que se lo ha encontrado también en el maíz dulce (fitoglucógeno).

El glucógeno puede extraerse de los tejidos con álcali a 100° C o tricloroacético frío (2), de esta manera se lo separa de las proteínas

y luego se lo precipita con alcohol. Los métodos de extracción más suaves como Cl_2Hg 3 % en frío (3), Fenol 80 % en frío (4), cloroformo y alcohol isoamílico (5) permiten extraer el glucógeno al estado nativo.

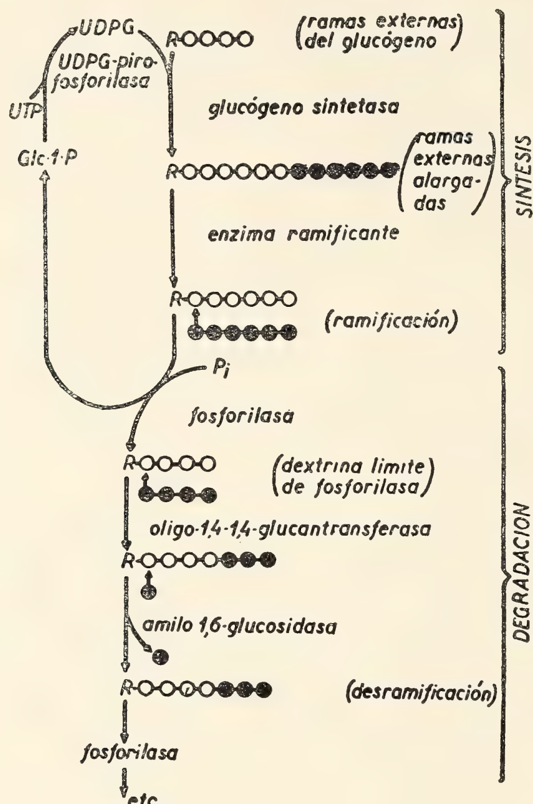


Fig. 1. — Síntesis y Degradación del Glucógeno. ○ ●, glucosas ; R, resto de una molécula de glucógeno ; Pi, fósforo inogánico ; —, unión glucosídica α 1.4 ; →, unión glucosídica α 1-6.

En el hígado parte del glucógeno se encuentra en la forma que Lazarow (6) llamó "glucógeno particulado".

Por métodos de metilación se pudieron establecer los principales tipos de unión entre las unidades constituyentes. Se demostró que está formado por unidades D-glucosilos conectados por uniones α 1-4 y α 1-6 (7). Estas últimas constituyen los puntos de ramificación y representan de un 8 a 10 % del total de las uniones. La obtención "in vitro" de un glucógeno semejante al nativo a partir de

G-I-P y las enzimas fosforilasa y ramificante puras (8), es una confirmación del tipo de uniones ya mencionadas.

Por hidrólisis con ácidos minerales se obtiene 99 % de glucosa.

Actualmente se acepta para el glucógeno la estructura multirramificada, en forma arbórea propuesta por Meyer (9).

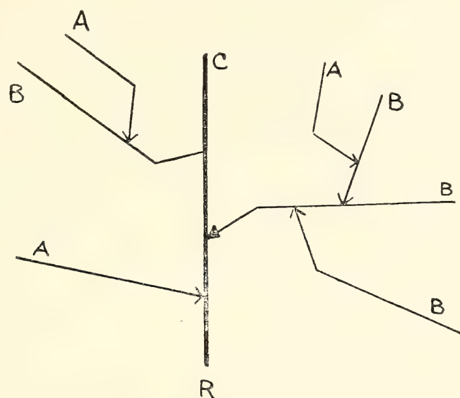


Fig. 2. — Estructura molecular del Glucógeno propuesta por Meyer. A, cadenas de glucosas ligadas por uniones α 1-4, sin ramas laterales; B, semejante a A, pero ligadas a otras por un punto de ramificación α 1-6; C, cadena principal que contiene al grupo reductor; R, grupo reductor.

TABLA I

Características del Glucógeno de Hígado

Propiedad	Valor	Referencia
Peso molecular	$1\text{-}3000 \times 10^6$	(8)
$\overline{\text{C}}$L-Longitud promedio de cadena (N° de glucosas)	10-14	(10)
Número de puntos de ramificación (α 1-6)	8-10 %	(10)
Límite de β-amilolisis	40-50 %	
Longitud de cadenas terminales (N° de glucosas)	6-9	(10)
Longitud de cadenas externas luego de la acción de β-amilasa	2,5	(10)
Longitud de cadenas terminales luego de la acción de la fosforilasa	4	(11)
Longitud de cadenas interiores	3-4	(10)
Longitud de onda de absorción máxima λmáx con el reactivo de Iodo-Cl_2Ca	460 mμ	(12)

Esto da como resultado una molécula globular muy compacta. Tiene un único grupo reductor R en uno de los extremos. Los grupos terminales de las ramas externas son no reductores.

Esta estructura multirramificada con cadenas relativamente cortas explica la gran solubilidad del glucógeno en el agua.

En la tabla I están resumidas las características principales del glucógeno de hígado.

Enzimas que intervienen en el metabolismo del glucógeno

La síntesis del glucógeno es catalizada por dos enzimas: la glucógeno sintentasa (G. Sint.) y la Ramificante.

Glucógeno Sintetasa de mamíferos (uridina difosfatoglucosa: glucógeno, α-4-glucosil transferasa).

En el año 1957, cien años después que Claude Bernard anunció el aislamiento del glucógeno, Leloir y Cardini ([13]) hallaron en el hígado de rata una enzima que transfiere la glucosa del UDPG al glucógeno y la llamaron G. Sint. (fig. 1). Posteriormente ([14]) estudiaron las propiedades de una preparación de músculo de rata, parcialmente purificada. Observaron que la síntesis de glucógeno se estimulaba notablemente por el agregado de extractos calentados de corazón de paloma. Demostraron que el activador era el *Glucosa*-6-fosfato (G-6-P) hasta ese momento se creía que la fosforilasa catalizaba "in vivo" tanto la síntesis como la degradación del glucógeno. A raíz del descubrimiento de la G. Sint. se planteó el problema de cuál de las dos enzimas era realmente la responsable de la síntesis "in vivo".

Basándose en la relación fósforo inorgánico Glucosa-1-fosfato presente en los distintos tejidos, el efecto de agentes glucogenolíticos (glucagon, adrenalina), las enfermedades por carencia de fosforilasa o de glucógeno sintetasa y por otros hechos experimentales se concluyó que la síntesis del glucógeno es catalizada por la G. Sint. y la degradación por la fosforilasa ([15]).

La G. Sint. forma uniones glucosídicas $\alpha\,1 \rightarrow 4$ alargando las cadenas exteriores preexistentes (fig. 1).

Esta enzima funciona eficientemente con un polisacárido como aceptor, pero también agrega unidades glucosas a oligosacáridos de la serie $\alpha\,1 \rightarrow 4$, aún a una molécula tan pequeña como la maltosa ([16]) pero con mucha menor eficiencia.

La glucógeno sintetasa se encuentra en dos formas (17-18) una activa y otra inactiva. La interconversión está esquematizada en la fig. 3.

La forma (I) representa a la enzima defosfrilada, cuyo grupo fosfato ha sido eliminado de la proteína enzimática por acción de una fosfatasa (19). Esta forma actúa independientemente del agregado de G-6-P. En cambio la otra forma (D) que ha sido fosforilada por acción de una kinasa en presencia de ATP y Mg^{++} (20-21) es inactiva, a menos que se le agregue G-6-P. Esto significa que la forma D tiene un requerimiento absoluto por la G-6-P.

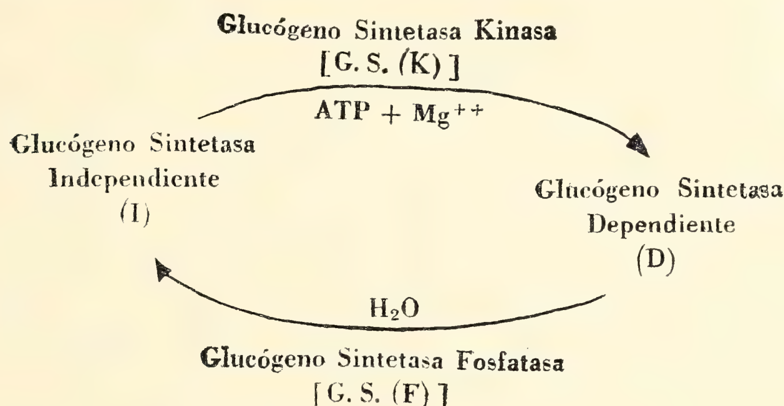


Fig. 3. — Interconversión entre las formas (I) y (D) de la glucógeno Sintetasa

ENZIMA RAMIFICANTE (α-1,4-glucan 6-glucosiltransferasa)

La actividad ramificante ha sido descripta primero por Cori y Cori (22) en extractos de corazón e hígado.

Larner (23) examinó la acción de la enzima ramificante contenida en extractos de hígado, usando como substrato un glucógeno cuyas ramas externas han sido alargadas por acción de la fosforilasa y glucosa -1-P-C^{14}.

Así comprobó que esta enzima catalizaba la transferencia de un oligosacárido lineal α 1 - 4 localizado en las ramas externas del glucógeno, hacia una posición α 1 - 6 (fig. 1). Demostró de esta manera que las unidades ligadas por el nuevo punto de ramificación (unión α 1 - 6) provienen de unidades que originalmente estuvieron conectadas por una unión α 1 - 4. Esta reacción puede ser considerada como una transglucosilación. En los últimos años han sido estudiadas las enzimas ramificantes de distintas fuentes.

La enzima ramificante contenida en los extractos de hígado ha sido purificada ([24]). Esta enzima es activada por alta concentración de sales. No libera azúcares reductores ya sea incubándola con amilosa, amilopectina o dextrina β- límite de amilopectina pero sí, produce una disminución notable en la densidad óptica correspondiente a los complejos que los respectivos polisacáridos forman con el iodo.

Incubando amilopectina con enzima ramificante se obtiene un polisacárido similar al glucógeno. Krisman ([4]) también observó que la enzima puede introducir ramas adicionales en la dextrina β-

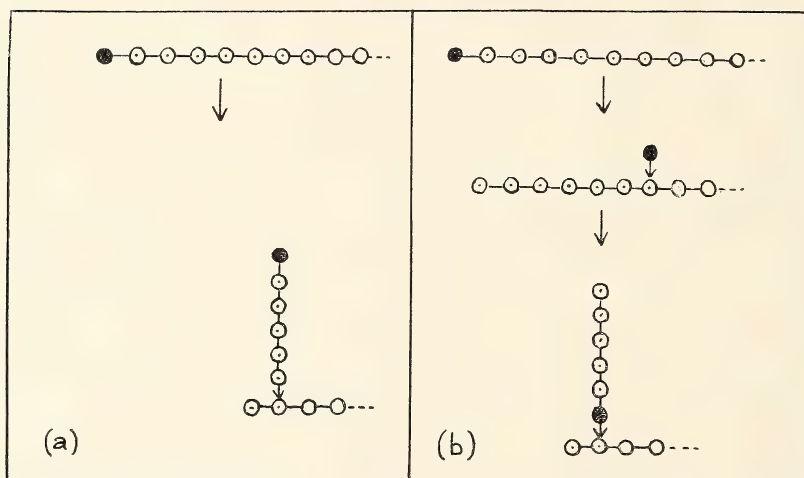


Fig. 4. — Según Verhue y Hers (25). Esquema de dos mecanismos posibles pata al ramificación de una rama externa del glucógeno ; ○ ⊙ ●, glucosas ; —, unión α 1-4 ; ↓, unión α 1-6 ; ⊙ ●, glucosas radioactivas (C^{14}) correspondientes al experimento de Larner ; ●, glucosa radioactiva (C^{14}) en los experimentos de Verhue y Hers.

límite de amilopectina ya que aumenta la β-amilolisis en un 8 %. Estos resultados indican que la enzima puede transferir cadenas con ramas laterales de por lo menos dos o tres unidades glucosas. La amilosa puede ser usada también como substrato.

Si bien Larner ([23]) demostró que esta enzima es capaz de transglucosilar fueron Verhue y Hers ([25]) quienes estudiaron el mecanismo, determinando la longitud mínima de la cadena transferida.

Podríamos representar el esquema de dos mecanismos posibles para que se produzca una ramificación.

En la fig. 4a, un trozo de cadena α 1 - 4 es transferida de la posición 4 a la posición 6, en este proceso la glucosa terminal ● ha que-

dado en la periferia. En la fig. 4b la glucosa terminal es la primera unidad transferida como tal a una posición 6, la cual posteriormente es seguida por una o varias transferencias α 1 - 4 a α 1 - 4.

Los experimentos de Larner no distinguen entre éstas dos posibilidades. Para aclarar esta diferencia, Verhue y Hers usaron como sustrato un glucógeno de cadenas externas alargadas, marcando con C^{14} solamente las glucosas de los extremos no reductores. Este sustrato lo incubaron con la enzima ramificante de hígado purificada de acuerdo al método descripto por Krisman ([24]). El polisacárido ramificado se analizó por oxidación con ácido periódico, indicando que los residuos glucosas-C^{14} permanecían en la posición terminal de la cadena después de la ramificación. Por incubación con pululanasa se obtuvo una mezcla de oligosacáridos radioactivos, siendo los más cortos maltohexaosa y en mayor proporción maltoheptaosa. Esto indica que la longitud mínima del oligosacárido transferido por la enzima es de 6 unidades glucosas. Por otro lado, la cadena se transfiere intacta fig. 4a descartándose el mecanismo 4b.

Determinaron también que la enzima de hígado no puede actuar sobre maltooligosacáridos más cortos que 16 unidades glucosas.

Un aspecto del mecanismo aún no aclarado es, si la transglucosilación se hace sobre la misma rama o sobre una vecina.

Enzima ramificante de músculos: Brown y Brown ([26]) han descripto la purificación de la enzima ramificante de músculo de conejo.

En base a los análisis de sedimentación la enzima tiene un peso molecular aparente entre 100.000 y 175.000. Difiere de la enzima de hígado en que tiene acción limitada sobre la amilosa y también es incompleta su acción sobre la amilopectina.

Los mejores sustratos para la ramificante de músculo parecen ser glucógenos cuyas ramas externas han sido alargadas por acción de G-1-P y fosforilasa o bien UDPG y glucógeno sintetasa.

También estudiaron el mecanismo de acción de esta enzima ([27]) demostrando que es semejante a la de hígado.

En los estudios hasta ahora realizados, no se ha aclarado el tamaño de las cadenas aceptoras.

Con las evidencias actuales, se puede afirmar que la síntesis del glucógeno por la glucógeno sintetasa y la enzima ramificante es un proceso secuencial, resultando en la formación de un polisacárido de estructura multirramificada.

Hasta el presente se ha obtenido una información muy valiosa en cuanto al control "in vivo" de la sintetasa y de la fosforilasa, no así sobre la enzima ramificante. Tampoco se sabe en qué estadio del desarrollo aparece esta enzima, si bien el glucógeno de hígado de feto de mamíferos, tiene estructura normal.

No se ha encontrado ningún sistema de regulación, por lo que se supone que está en exceso.

En ciertos casos excepcionales, el nivel detectable de la enzima ramificante, es selectivamente reducido respecto de las otras enzimas que intervienen en el metabolismo del glucógeno. Esta deficiencia enzimática es conocida como "enfermedad del glucógeno" o glucogenosis Tipo IV o "Amilopectinosis" que se caracteriza por la acumulación de amilopectina.

Brown y Brown ([28]) fueron los primeros que trataron de medir la actividad de la enzima ramificante en un caso de "amilopectinosis". La existencia de algunas uniones α 1 - 6 podría explicarse por la presencia de otra enzima ramificante no detectable o bien, la enzima estaría en el estado fetal, disminuyendo en vez de aumentar, después del nacimiento.

El control genético de los niveles de actividad enzimática en todas las glucogenosis, no está muy bien aclarado.

El punto de partida para la síntesis del glucógeno a través de la UDPG pirofosforilasa es la G-1-P (fig. 1). El producto principal de la degradación del glucógeno también es la G-1-P. La fosforilasa es la enzima responsable de este proceso. Su acción consiste en el acortamiento de las ramas exteriores. La fosforólisis sucesiva de las uniones glucosídicas α 1 - 4, se detiene a una distancia de 4 unidades glucosas próximas a un punto de ramificación ([11]).

El polisacarido remanente es una dextrina límite de fosforilasa (φ-dextrina). Para eliminar el obstáculo, que es la unión α 1 - 6, intervienen dos enzimas: oligo-1,4-1,4 glucan-transferasa y la amilo 1,6 glucosidasa, entonces nuevamente puede continuar su acción degradativa la fosforilasa (fig. 1).

Fosforilasa (α-1,4-glucano: ortofosfato glucosiltransferasa):

Esta enzima ha sido descubierta en 1936 por C. y G. Cori ([29]). En el músculo esquelético y cardíaco la fosforilasa se encuentra en dos formas interconvertibles entre sí ([30] y [31]). Una de ellas es la fosforilasa (*b*) que es inactiva en ausencia AMP mientras que la

otra fosforilasa *a* no requiere el agregado de dicho nucleótido para su actividad. En el músculo en reposo se encuentra totalmente en la forma (*b*) ([31]).

La transformación de la fosforilasa (*b*) en (*a*) implica una fosforilación de la proteína enzimática. Requiere ATP y Mg^{++} y es la Fosforilasa (*b*) Kinasa la enzima que cataliza este proceso ([32, 33, 34]).

La transformación inversa de fosf. (*a*) en fosf. (*b*) implica una defosforilación y la enzima que interviene es la Fosforilasa (*a*) Fosfatasa ([35, 36, 37]).

La interconversión entre ambas formas está esquematizada en la fig. 5.

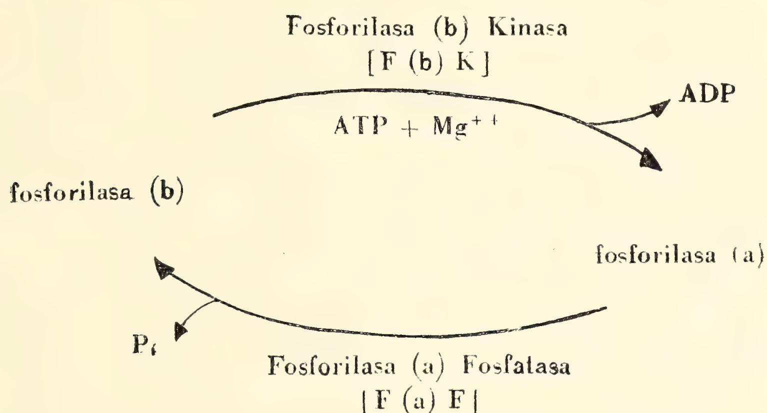


Fig. 5. — Interrelación entre las formas : *a* y *b*, de la fosforilasa

La fosforilasa (*b*) tiene un peso molecular de 250.000 y se descompone en dos subunidades de 125.000 por tratamiento con compuestos que reaccionan con grupos - SH. Tiene como cofactor al piridoxal fosfato. Hasta hace poco tiempo se pensaba que la reacción catalizada por la F (*b*) K no sólo implicaba una fosforilación sino una duplicación del peso molecular.

Actualmente por los trabajos de Graves ([38]) se sabe que la fosforilasa (*a*) dimero es mucho más activa que la fosf. (*a*) tetrámero y que el glucógeno inhibe el pasaje del dímero al tetramero.

El esquema de la interconversión de las fosforilasas es más complejo, ya que la F (*b*) K ([39, 40, 41]) como la F(*a*)F ([42]) existen a su vez en dos formas activas e inactivas también interconvertibles.

En el hígado ([43, 44, 45, 46]) se encontraron actividades similares a las mencionadas en músculo respecto del sistema de interconversión.

La única diferencia parece residir a nivel de la fosforilasa inactiva, la que aún en presencia de AMP no manifiesta actividad.

Sistema de desramificación:

Para desramificar la φ-dextrina, polisacárido resistente a la acción de la fosforilasa se requiere la acción combinada de dos enzimas.

Una es la oligo 1,4 - 1,4 glucan transferasa ([47]) que transfiere un oligosacárido de tres glucosas (fig. 1) a la rama vecina ([48]), exponiendo la glucosa del punto de ramificación. Esa glucosa unida en α 1 - 6 es hidrolizada por la amilo 1,6 glucosidasa ([49, 50]).

Brown e Illingworth ([51]) no lograron separar las dos enzimas, y sugirieron que ambas actividades pertenecían a una misma proteína.

La evidencia en contra de esta idea resultó del estudio de una glucogenosis del Tipo III-D ([52]) en el cual no hay amilo-1,6-glucosidasa y en cambio hay actividad de oligo-1,4-1,4-transferasa.

Otras enzimas degradantes del glucógeno

α-amilasa:

Esta enzima se encuentra en hígado, sangre, páncreas, saliva. El mecanismo de acción supone ([53]) primero la liberación de maltotriosa, maltotetraosa, maltopentasa y algo de maltosa por ataque a los extremos no reductores de la molécula. En la segunda etapa se libera maltosa y oligosacáridos ramificados debido a una degradación del interior de la molécula. En el hígado ([54]) se encuentra localizada en la fracción microsomal y es activada por detergentes. La α amilasa microsomal no está unida al glucógeno.

Se desconoce el papel que desempeña en el metabolismo del polisacarido "in vivo".

γ-amilasas:

También llamadas glucosidasas ya que liberan glucosa a partir de los extremos no reductores de las ramas externas del glucógeno.

En hígado se han descripto dos, una lisosomal de pH óptimo entre 5 y 6 se la llamó también glucosidasa ácida ([55]), otra neutra ([56]) presente en el citoplasma tiene un pH óptimo entre 6 y 7.

β-amilasa:

Esta enzima encuentra exclusivamente en vegetales. Ataca al glucógeno comenzando por las puntas no reductoras liberando maltosa y deteniéndose a 2 ó 3 residuos glucosídicos antes de la ramificación ([57]).

Síntesis y regulación de glucógeno en levadura

El glucógeno y la trehalosa cumplen, en las levaduras, funciones de hidratos de carbono de reserva. El primero se encuentra parcialmente como polisacárido particulado y la segunda se halla libre en el citoplasma.

El contenido de trehalosa varía según las condiciones de crecimiento. En algunos casos puede estar ausente y en otros alcanza concentraciones de hasta 0.1 M. Estas circunstancias han hecho pensar que aunque no es esencial para la levadura, es posible que participe en el proceso de regulación de la presión osmótica adecuada para la célula.

Las levaduras en crecimiento logarítmico contienen muy poco glucógeno; éste se acumula hacia el final de la fase exponencial y durante la estacionaria, llegando a constituir el 4 a 5 % del peso seco total del microorganismo. Cuando la glucosa externa del medio se mantiene constante durante varias horas por agregado del azúcar, el glucógeno puede aumentar hasta el 18 % del peso seco de la levadura. Estas variaciones del contenido de glucógeno en distintos momentos del ciclo de crecimiento, permiten suponer que al comienzo de la fase logarítmica ocurre una rápida utilización del polisacárido, que suministraría la energía necesaria para una serie de procesos vitales. La estructura del glucógeno de levadura es semejante a la mencionada al comienzo de este capítulo (Fig. 1).

El metabolismo de este polisacárido se efectúa, en levadura, en forma similar a la descripta para tejidos animales.

La fosforilasa de levadura ha sido muy poco estudiada y no se conocen aún muchas de sus propiedades. Las enzimas ramificante y desramificante son semejantes a las aisladas de mamíferos ([58]).

Glucógeno sintetasa y su papel en la regulación de la síntesis del polisacárido

La enzima fue aislada y purificada por Algranati y Cabib [59, 60]. Una preparación libre de glucógeno se utilizó para estudiar la capacidad de "primer" de distintas sustancias, y se determinó que contrariamente a lo que sucede con la enzima de hígado y músculo, la glucógeno sintetasa de levadura no es capaz de utilizar oligosacáridos como aceptores.

El nucleótido UDP actúa como inhibidor que compite con el sustrato (UDPG) por el mismo sitio de la enzima.

Como ocurre con preparaciones de hígado y músculo también en levadura la G6P es un activador de la biosíntesis de glucógeno, y no un simple protector de la enzima; pero a diferencia de aquellos casos en que la activación puede ser muy grande, con extractos de levadura es sólo del orden de 2 a 3 veces a pH neutro.

El efecto de G6P sobre la biosíntesis de glucógeno es posiblemente el primer caso estudiado de "activación por precursor"; se manifiesta por un aumento de la velocidad máxima sin modificar la afinidad de la enzima por el UDPG [61, 62].

La glucógeno sintetasa de levadura presenta dos curvas de pH netamente diferentes cuando se ensaya en presencia y en ausencia de G6P. Este hecho sugirió desde un principio que la enzima podría existir en dos formas interconvertibles reversiblemente [60].

La especificidad del activador es similar a la observada con enzima de hígado; aunque la glucosa 6 P y la glucosamina 6 P son los más eficientes, otras sustancias como ácido 3 fosfoglicérico, sulfato y fosfato también estimulan la reacción [64].

Rothman y Cabib [61] demostraron que la glucógeno sintetasa de levadura es inhibida por altas concentraciones de algunos aniones como el cloruro, el maleato, etc. Este efecto puede revertirse completamente por el agregado de G6P, que por otra parte no es capaz de eliminar la inhibición competitiva producida por el UDP. La reversión de la inhibición es un proceso sumamente específico ya que sólo sucede con glucosa 6 P y glucosamina 6 P. La cinética de la enzima en función de la concentración de sustrato es hiperbólica en presencia o ausencia de cloruro. En cambio los ensayos con G6P y cloruro muestran efectos cooperativos cuando se mide la velocidad de la reacción en función de concentraciones variables de uno de ellos y se mantiene constante el nivel del otro. Estos resultados

sugirieron que el cloruro es un inhibidor alostérico, hipótesis que se confirmó por tratamiento de la glucógeno sintetasa con 2,4 dinitro-fluorbenceno en presencia de UDPG. La enzima modificada conservó casi toda su actividad, pero perdió su sensibilidad al efecto del cloruro, sin alterar su capacidad de ser activada por G6P o inhibida por UDP, lo que indicaría que los sitios para el sustrato y el activador han quedado más o menos intactos.

Al pH fisiológico de la levadura, alrededor de 6, una serie de metabolitos comunes como fosfoenolpiruvato, ATP, ADP y GTP se comportan como inhibidores mucho más eficientes que el cloruro. En todos estos casos se puede lograr una máxima reactivación de la enzima, que se puede estimular hasta 20 veces, por agregado de G6P a concentración 0.2 mM.

Los niveles intracelulares de ATP y ADP son suficientes para mantener inhibida la glucógeno sintetasa; en este caso la actividad de la enzima y por lo tanto la síntesis de glucógeno, quedaría regulada por la concentración de G6P, controlada a su vez por la reacción de la fosfofructoquinasa. Esta se inhibe por ATP y activa por AMP, es decir, depende del estado energético de la célula que en esta forma determinaría indirectamente la velocidad de formación de la glucógeno. Cuando la relación de ATP a AMP es alta, la fosfofructoquinasa estaría inhibida y la G6P se acumularía contrarrestando la inhibición de la glucógeno sintetasa. Una disminución del ATP y aumento de AMP produciría el efecto contrario, es decir un descenso del nivel de G6P por activación de la fosfofructoquinasa con la consiguiente imposibilidad de revertir la inhibición de la síntesis del glucógeno.

El efecto del ion amonio que "in vivo" disminuye drásticamente la formación del polisacárido, se puede explicar por su efecto activador de la fosfofructoquinasa que consume gran parte del G6P disponible.

Por estudios realizados "in vivo" en varias condiciones ([63]) se han medido los niveles intracelulares de glucógeno y de varios metabolitos. Los resultados corroboran plenamente la hipótesis de que la síntesis de glucógeno está regulada por la concentración de G6P, ya que es el único que se modifica en circunstancias en que el UDPG, ATP, ADP y AMP permanecen aproximadamente constantes.

El efecto de los nucleótidos al pH fisiológico de la levadura ([64]) es del mismo tipo que la inhibición alostérica ya descripta para

algunos aniones. Las curvas sigmoideas de velocidad de la reacción con G6P en presencia de ATP o viceversa, sugieren que ambos efectores se unen a sitios distintos de la enzima. Esta conclusión también se apoya en el hecho de que la G6P no es capaz de proteger el sitio del inhibidor cuando se somete la enzima a dinitrofenilación que suprime la sensibilidad al ATP.

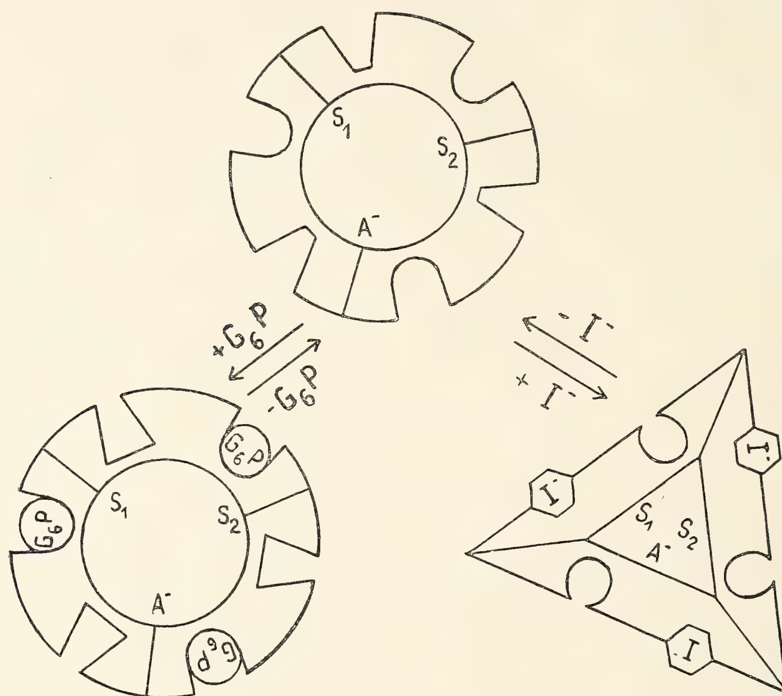


Fig. 6. — Esquema de interacción entre glucógeno sintetasa y sus efectores alostéricos S_1 y S_2 son los sitios del sustrato UDPG y del « primer » glucógeno. A— es un sitio inespecífico para un activador aniónico. I— es el inhibidor alostérico.

Los coeficientes de Hill indican posiblemente un mínimo de 3 sitios para cada efector.

Los dos efectos de la G6P (activación en ausencia de inhibidores, y reversión de la inhibición) parecen distintos. En el primero la hexosa fosfato sólo modifica la velocidad máxima de la reacción, mientras que como reactivador también afecta la afinidad de la enzima por el sustrato. Además este efecto de reversión de la inhibición es mucho más específico. En base a todas estas relaciones Rothman y Cabib (61) han propuesto un esquema de interacción entre la enzima y sus efectores (Figura 6).

En este modelo el sustrato y el aceptor ocuparían un solo sitio cada uno; además se ha supuesto un sitio para un activador inespecífico y la existencia de 3 subunidades regulatorias. De todas las conformaciones posibles de la enzima se han representado 3 casos extremos: 1) en ausencia de inhibidores; 2) saturada con G6P y 3) saturada con inhibidor. La unión de la G6P modificaría los sitios del inhibidor dificultando o impidiendo que éste se combine con la enzima. Por otra parte el inhibidor tendría un efecto semejante sobre los sitios específicos para el azúcar fosfato.

Recientemente se han descripto las formas glucosa-6-fosfato independiente (I) y dependiente (D) de la enzima glucógeno sintetasa de levadura ([65]). Además se demostró la interconversión entre ambas formas y que la inhibición por ATP es mucho más intensa sobre la forma D. Es interesante mencionar la existencia de una mutante que no acumula glucógeno durante el crecimiento. En esta cepa la glucógeno sintetasa se encuentra totalmente en la forma D y parece alterado el sistema de transformación a la forma I.

Considerando todos estos resultados junto con los mencionados anteriormente se podría concluir que el control de la glucógeno sintetasa en levadura depende del nivel de G6P presente y de la interconversión entre las formas D e I de la enzima, como sucede en otros organismos. Cuando predomina una de las formas la concentración del azúcar fosfato regula directamente la actividad de la enzima y por lo tanto la acumulación del glucógeno.

Metabolismo de glucógeno en hongos y protozoarios

Se ha demostrado la existencia de dos formas interconvertibles de glucógeno sintetasa en un hongo ascomicete, la *Neurospora crassa*: una forma dependiente y otra independiente de G6P. La conversión de la forma I a la D requiere "in vitro" ATP-Mg^{++}; la inversa, de D a I, precisa Mg^{++} ([66]). La glucógena fosforilasa de este hongo también presenta dos formas interconvertibles: una activa (la forma *a*) y la otra casi inactiva (forma *b*). La actividad enzimática de la forma *a* no es afectada por la presencia de AMP, en cambio la forma *b* es estimulada por este nucleótido. La conversión de la forma *b* a la *a* requiere ATP - Mg^{++} y se estimula por la presencia de 3′, 5′ AMP ([67]). Es interesante destacar que se ha detectado actividad de adenilciclasa unida a membrana en micelio de *Neurospora crassa* ([68]). También se ha estudiado la glucógeno sin-

tetasa de un hongo acuático, *Blastocladiella emersonii* ([69]), que es activada en mayor o menor grado por G6P según la fase del ciclo de crecimiento. Así, en las zoosporas la estimulación de la enzima puede ser de 90 veces, y sólo 4 para la sintetasa de células en crecimiento. La reacción se inhibe por nucleótidos y derivados; la inhibición por ATP puede ser totalmente revertida por G6P. El ATP actúa en concentraciones probablemente fisiológicas, y los efectos de G6P "in vitro" también se obtienen con concentraciones relativamente bajas. El metabolismo del glucógeno también se está investigando en un protozoario ciliado, la *Tetrahymena piriformis* ([70, 71]). Varios hechos llevaron a formular la hipótesis que éste contiene un primitivo sistema de control metabólico intracelular, con algunas características similares a los sistemas metabólicos intercelulares encontrados en organismos superiores. El microorganismo contiene catecolaminas y serotonina y el agregado de algunos compuestos afecta el contenido de glucógeno de la célula. El polisacárido disminuye si el protozoario se crece en presencia de reserpina o de dicloroisoproterenol, un agente bloqueante β-adrenérgico, y aumenta si se cultiva con teofilina. Si se ensayan las actividades de glucógeno sintetasa y de fosforilasa cuando se crece el organismo con distintos agregados, se observa que en presencia de glucosa y teofilina aumenta la actividad de sintetasa y disminuye la de fosforilasa. La reserpina y el dicloroisoproterenol no afectan la actividad de la sintetasa, pero aumenta la de fosforilasa; la triiodotironina no afecta esta última pero inhibe la actividad de sintetasa. Esos efectos son opuestos a los observados en mamíferos. La *Tetrahymena* posee una fosfodiesterasa para 3′, 5′ AMP cíclico, que es inhibida por cafeína y teofilina.

Biosíntesis y regulación de glucógeno en bacterias

En algunos microorganismos las condiciones poco favorables para el crecimiento pero no para la asimilación de fuentes de C pueden provocar la acumulación de glucógeno como material de reserva. Esta síntesis se produce, en presencia de glucosa exógena, especialmente por limitación de N y S ([72, 73]). En ausencia del hidrato de carbono, el glucógeno puede utilizarse para los procesos celulares de mantenimiento ([74, 75, 76]).

El esquema general de síntesis del glucógeno en bacterias es semejante al de organismos superiores ya descripto (fig. 1). Existen, sin embargo, algunas diferencias fundamentales, a saber el nucleó-

tido dador de grupos glucosilos es el ADPG en vez del UDPG, y el sistema de regulación es diferente.

Para la síntesis intervienen pues, fundamentalmente, la glucógeno sintetasa, que transfiere grupos glucosilos del ADPG a un α 1,4 glucano aceptor, y la enzima ramificante. También tiene un papel importante la ADPG pirofosforilasa, que cataliza la formación del nucleótido dador ADPG a partir de ATP y G1P, o su degradación en estos compuestos: ATP + G-1-P $\rightleftarrows$ ADPG + PP_i. Las enzimas degradativas del glucógeno han sido menos estudiadas en bacterias: se conoce la glucógeno fosforilasa de *Escherichia coli* y también se ha descripto una enzima amilolítica que tiene poca afinidad por sustratos ramificados.

Las enzimas que intervienen en la síntesis de glucógeno están presentes ya en la fase logarítmica, en que las células almacenan muy poco o nada de glucógeno. El mecanismo por el cual comienza la acumulación de glucógeno al reducirse la velocidad de crecimiento (comienzo de la fase estacionaria) todavía no se conoce.

Glucógeno sintetasa: Esta enzima ha sido encontrada en numerosas especies bacterianas: *Aerobacter aerogenes, Arthrobacter viscosus, Micrococcus lysodeikticus, Rhodopseudomonas capsulata, Rhodospirillum rubrum, Escherichia coli B* ([77]), *Bacillus stearothermophilus* ([78]). La especificidad del ADPG como dador de grupos glucosilos es muy alta en todos los casos ([78, 79, 80]); en algunas especies se ha podido comprobar que *d*ADPG tiene un 70-80 % de eficiencia con respecto al ADPG. Como prueba corroborativa de la especificidad del ADPG se puede mencionar la existencia de algunas mutantes de *E. coli* que no pueden sintetizar UDPG y sin embargo acumulan glucógeno ([73]). No se observa ninguna activación de la glucógeno sintetasa con G6P ni otros intermediarios glucolíticos, a diferencia de la enzima de mamíferos y de levadura.

Enzima ramificante. Ha sido detectada en extractos de *Arthrobacter globiformis* ([81]) y de *E. coli* ([82]). La enzima ramificante aislada de estas especies bacterianas se asemeja a la de tejidos animales y levadura, puesto que actúa "in vitro" introduciendo uniones glucosídicas α 1,6 no sólo en amilosa, sino también en amilopectina.

ADPG pirofosforilasa: Es a nivel de esta enzima que se efectúa la regulación de la síntesis de glucógeno en bacterias, mientras que en mamíferos y levadura el control se produce en la glucógeno sintetasa, como ya se ha descripto.

La ADPG pirofosforilasa de bacterias (también la de algas verdes y hojas de plantas superiores) se activa por intermediarios glucolíticos e inhibe por AMP, ADP o Pi ([83, 84, 85, 86]). Esto sugiere que la síntesis de ADPG se regula en parte por la carga energética de la célula ([87]) y por la disponibilidad de una fuente de C en exceso que produciría la acumulación de intermediarios glucolíticos. Como el ADPG es el único dador de grupos glucosilos, el control de la síntesis del nucleótido-azúcar regularía a su vez la biosíntesis del glucógeno.

La especificidad de la ADPG pirofosforilasa por su efector varía según el origen de la enzima. Así, la de *E. coli B* ([83]) se activa por FDP y es muy sensible a la inhibición por AMP mientras que la de *Arthrobacter viscosus* ([84]), *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhodopseudomonas capsulata* ([85]), se activa por F6P y piruvato y se inhibe por ADP, AMP o Pi. La ADPG pirofosforilasa de *Rhodospirillum rubrum* ([86]) se estimula por piruvato y es relativamente insensible a la inhibición. Es interesante observar que hay una correlación entre la especificidad del activador de la ADPG pirofosforilasa de un organismo y el tipo de metabolismo que efectúa. Así, las bacterias que catabolizan la glucosa fundamentalmente por vía glucolítica se activan por FDP, mientras que *A. tumefaciens*, *R. capsulata* y *A. viscosus*, que degradan glucosa principalmente por el camino de Entner-Doudoroff, se estimulan por F6P; la enzima de *R. rubrum*, por otra parte, que no puede metabolizar glucosa y crece bien en intermediarios del ciclo tricarboxílico, sólo se activa por piruvato.

En *E. coli* B, además de FDP, son activadores eficaces el TPNH y el piridoxal fosfato ([88]). Al haber acumulación de intermediarios glucolíticos (con una fuente de C en exceso, como la glucosa), el poder reductor ya no es necesario para reacciones biosintéticas y hay acumulación de TPNH. Este aumento produciría en la fase estacionaria una activación de la ADPG pirofosforilasa, que a su vez estimularía la síntesis de glucógeno.

La importancia de las distintas enzimas que participan en la síntesis de glucógeno se puede demostrar con el aislamiento de diversas mutantes. Fundamentalmente se han aislado 3 tipos de mutantes de *E. coli* (glg A, glg B y glg C) que tienen alterado el metabolismo del glucógeno ([89, 90]) y que pueden distinguirse por la coloración con iodo de las colonias en las placas de cultivo. A diferencia de las colonias de tipo salvaje que dan un color pardo con iodo, las de la mutante glg A quedan incoloras, las glg B dan colonias azules y las glg C "super marrones". En las últimas la acumulación de glucó-

geno se observa no sólo en la fase estacionaria sino también en la logarítmica. Se ha podido comprobar que en la mutante glg A falta la glucógeno sintetasa y en la glg B la enzima ramificante. En las glg C que tienen mayor acumulación de glucógeno, no hay mayor nivel de las enzimas sintetizantes; se ha demostrado que la mutación afecta el gen estructural de la ADPG pirofosforilasa, que ya no es inhibida por AMP y muestra mayor sensibilidad a la activación por FDP.

Fosforilasas: Se han descripto en *E. coli* la maltodextrina fosforilasa, enzima inducible que cataliza la fosforólisis de dextrinas lineales de cadena corta y además la glucógeno fosforilasa ([91]), enzima constitutiva que degrada preferentemente glucógeno. Ambas enzimas son ligeramente estimuladas por AMP, la glucógeno fosforilasa se activa también por FNa y SO_4Na_2. La actividad específica de la glucógeno fosforilasa es relativamente baja, pero esto concuerda con el papel de la enzima en la lenta degradación de glucógeno endógeno durante el largo período de fase estacionaria. Salvo por este hecho, la enzima bacteriana es semejante en muchos aspectos a las fosforilasas de otras fuentes: requiere un "primer" poliglucosa, contiene piridoxal fosfato y grupos —SH vitales, es activada por AMP y sales e inhibida por algunos nucleósido difosfato azúcares (ADPG, TDPG y UDPG).

Amilasa: Se conoce en la literatura una serie de α amilasas bacterianas, que tienen como característica la de ser exocelulares. Las únicas descriptas como enzimas intracelulares son una α amilasa de *Streptococcus bovis* ([92]) y otra aislada y purificada de *E. coli* ([93]). Por sus propiedades, ésta se aproxima más a la de mamíferos: tiene un pH óptimo cercano a 7, necesita Cl^- para su actividad y la integridad de los grupos —SH. Sin embargo, "in vitro" por lo menos, esta enzima parece actuar preferentemente sobre polisacáridos lineales del tipo de la amilosa, o bien sobre ramas externas de amilopectina y glucógeno con menor eficacia. Esta amilasa no parece tener papel importante en la degradación del glucógeno.

REFERENCIAS

1. Krebs, H., Proc. Royal Soc. London B, *159*, 545 (1964).
2. Stetten, De Witt y Stetten, Marjorie, Polysaccharides in Biology 9 (1957).
3. Mordoh, J., Krisman, C. R. y Leloir, L. F., Arch. Bioch. Biophys. *113*, 265 (1966),

4. Laskov, R. y Margoliash, E., Bull. Res. Counc. Israel, Sect. A *11*, 351 (1963).
5. Sevag, M. G., Lackman, D. B. y Smolens, J., J. Biol. Chem. *124*, 425 (1938).
6. Lazarow, A., Anat. Record *84*, 31 (1942).
7. Manners, D. J., Adv. Carb. Chem. *12*, 262 (1957).
8. Mordoh, J., Leloir, L. F. y Krisman, C. R., PNAS *53*, 86 (1965).
9. Meyer, K. H. y Fuld, M., Helv. Chim. Acta *24*, 375 (1941).
10. Manners, D. J., Adv. Carb. Chem. *17*, 371 (1962).
11. Walker, G. J. y Whelan, W. J., Biochem. J. *76*, 264 (1960).
12. Krisman, C. R., Anal. Bioch. *4*, 17 (1962).
13. Leloir, L. F. y Cardini, C. E., J. Am. Chem. Soc. *79*, 6340 (1957).
14. Leloir, L. F., Olavarría, J. M., Goldemberg, S. H. y Carminatti, H., Arch. Bioch. Biophys. *81*, 508 (1959).
15. Leloir, L. F., Harvey Lectures 23 (1961).
16. Goldemberg, S. H., Biochim. Biophys. Acta *56*, 357 (1962).
17. Traut, R. R., Doctoral Thesis, Faculty of the Rockefeller Institute (1962).
18. Villar-Palasi, C. y Larner, J., Arch. Bioch. Biophys. *94*, 436 (1961).
19. Friedman, D. L. y Larner, J., Biochemistry *2*, 669 (1963).
20. Rosell, Pérez y Larner, J., Biochemistry *3*, 81 (1964).
21. Huijind, F. y Larner, J., Proc. Nat. Acced. Sci. *56*, 647 (1966).
22. Cori, C. y Cori, G., J. Biol. Chem. *151*, 57 (1943).
23. Larner, J., J. Biol. Chem. *202*, 491 (1953).
24. Krisman, C. R., Bioch. Biophys. Acta *65*, 307 (1962).
25. Verhue, W. y Hers, H. G., Biochem. J. *99*, 222 (1966).
26. Brown, D. H. y Brown, B. I., Meth. Enz. Vol. *8*, 395 (1966).
27. — Bioch. Biophys. Acta *130*, 263 (1966).
28. — Proc. Nat. Acad. Sci. *56*, 725 (1966).
29. Cori, C. y Cori, G., Proc. Soc. Exptl. Med. *34*, 702 (1936).
30. Fischer, E. H. y Krebs, E. G., J. Biol. Chem. *231*, 65 (1960).
31. Krebs, E. G. y Fischer, E. H., Advances in Enzymology *24*, 277 (1962).
32. Krebs, E. G., Kent, A. B. y Fischer, E. H., J. Biol. Chem. *231*, 73 (1958).
33. Krebs, E. G. y Fischer, E. H., Biochim. Biophs. Acta *20*, 150 (1956).
34. Krebs, E. G., Biochemistry *3*, 1022 (1964).
35. Fischer, E. H., Hurd, S. S., Nova, W. B. y Krebs, E. G., Biochem. J. *89*, 398 (1963).
36. Keller, P. J. y Cori, C. F., J. Biol. Chem. *214*, 127 (1965).
37. Graves, D. J., Fischer, E. H. y Krebs, E. G., J. Biol. Chem. *235*, 805 (1960).
38. Wang, J. H., Shonka, M. L. y Graves, D. J., Biochemistry *4*, 2296 (1965).
39. Krebs, E. G., Graves, D. J. y Fischer, E. H., J. Biol. Chem. *234*, 2867 (1959).
40. Delange, R., Kemp, R. G., Dixon, Riley W., Cooper, P. A. y Krebs, E. G., J. Biol. Chem. *243*, 2200 (1968).
41. Dixon, Riley W., Delange, R., Bratvold, G. E. y Krebs, E. G., J. Biol. Chem. *243*, 3763 (1968).
42. Chelala, C. A. y Torres, H. N., Biochim. Biophys. Acta *178*, 423 (1969).
43. Sutherland, E. W. y Wosilart, W. D., J. Biol. Chem. *218*, 459 (1956).
44. Wosilart, W. D. y Sutherland, E. W., J. Biol. Chem. *218*, 469 (1956).
45. Sutherland, E. W. y Wosilart, E. W., J. Biol. Chem. *218*, 483 (1956).
46. Sutherland, E. W. y Rall, T. W., Pharmacol. Rev. *12*, 265 (1960).

47. Abdullah, M., Taylor, P. M. y Whelan, W. J., *Control of Glycogen Metabolism*, Ciba Found Symp. 123 (1964).
48. Brown. D. H. e Illingworth, B., Proc. Nat. Acad. Sci. *48*, 1783 (1962).
49. Larner, J. y Schliselfeld, Biochim. Biophys. Acta *20*, 53 (1956).
50. Nelson, T. E., Palmer, D. H. y Larner, J., Biochim. Biophys. Acta *212*, 269 (1970).
51. Brown, D. H. e Illingworth, B., *Control of Glyc. Met.*, Ciba Found Symp. 139 (1964).
52. Hers, H. G., Verhue, H. y Mathieu, M., *Control of Glyc. Met.*, Ciba, 151 (1964).
53. Olavarría, J. M. y Torres, H. N., J. Biol. Chem. *237*, 1746 (1962).
54. Mordoh, J., Krisman, C. R., Parodi, A. J. y Leloir, L. F., Arch. Bioch. and Bioph. *127*, 193 (1968).
55. Rosenfeld, E. L., *Control Glyc. Met.*, Ciba, 176 (1964).
56. Torres, H. N. y Olavarría, J. M., J. Biol. Chem. *239*, 2427 (1964).
57. Manners, D. J., Biochem. J. *100*, 2-3P (1966).
58. Gunja, Z. H., Manners, D. J. y Maung, K., Biochem. J. *75*, 441 (1960).
59. Algranati, I. D. y Cabib, E., Bioch. Bioph. Acta *43*, 141 (1960).
60. — J. Biol. Chem. *237*, 1007 (1962).
61. Rothman, L. B. y Cabib, E., Biochemistry *6*, 2098 (1967).
62. Rothman, L. B., Tesis (Fac. Cs. Exactas y Naturales, 1967).
63. Rothman, L. B. y Cabib, E., Biochemistry *8*, 3332 (1969).
64. — Biochemistry *6*, 2107 (1967).
65. Rothman-Denes, L. B. y Cabib, E., Proc .Natl. Acad. Sci. U.S., *66*, 967 (1970).
66. Téllez-Iñón, M. T., Terenzi, H. y Torres, H. N., Bioch. Bioph. Acta *191*, 765 (1969).
67. Téllez-Iñón, M. T. y Torres, H. N., Proc. Nat. Ac. Sc. U.S.A. *66*, 459 (1970).
68. Flawia, M. M., Resultados no publicados.
69. Camargo, E. P., Meuser, R. E. y Sonneborn, D., J. Biol. Chem. *244*, 5910 (1969).
70. Blum, J. J., Proc. Nat. Ac. Sc. U.S.A. *58*, 81 (1967).
71. — Arch. Bioch. Bioph. *137*, 65 (1970).
72. Holme, T. y Palmstierna, H., Acta Chem. Scand. *10*, 578 (1956).
73. Sigal, N., Cattanéo, J. y Segel, J. H., Arch. Bioch. Bioph. *108*, 440 (1964).
74. Holme, T. y Palmstierna, H., Acta Chem. Scand. *10*, 1557 (1956).
75. Dawes, E. A. y Ribbons, D. W., Bioch. J. *82*, P 49 (1962).
76. Antoine, A. D. y Tepper, B. S., J. Gen. Microb. *55*, 217 (1969).
77. Greenberg, E. y Preiss, J., J. Biol. Chem. *239*, PC 4314 (1964).
78. Goldemberg, S. H. y Algranati, I. D., Bioch. Bioph. Acta *177*, 166 (1969).
79. Greenberg, E. y Preiss, J., J. Biol. Chem. *240*, 2341 (1965).
80. Preiss, J. y Greenberg, E., Biochem. *4*, 2328 (1965).
81. Zevenhuizen, L.P.T.M., Bioch. Bioph. Acta *81*, 608 (1964).
82. Sigal, N., Cattanéo, J., Chambost, J. P. y Favard, A., Bioch. Bioph. Res. Comm. *20*, 616 (1965).
83. Preiss, J., Shen, L., Greenberg, E. y Gentner, N., Biochem. *5*, 1833 (1966).
84. Shen, L. y Preiss, J., Arch. Bioch. Bioph. *116*, 375 (1966).
85. Eidels, L., Edelman, P. L. y Preiss, J., Arch. Bioch. Bioph. *140*, 60 (1970).

86. Furlong, C. E. y Preiss, J., J. Biol. Chem. *244*, 2539 (1969).
87. Atkinson, D. E., Ann. Rev. Bioch. *35*, 85 (1966).
88. Gentner, N., Greenberg, E. y Preiss, J., Bioch. Bioph. Res. Comm. *36*, 373 (1969).
89. Cattanéo, J., Damotte, M., Sigal, N., Sánchez-Medina, F. y Puig, J., Bioch. Bioph. Res. Comm. *34*, 694 (1969).
90. Govons, S., Vinopal, R., Ingraham, J. y Preiss, J., J. Bacter. *97*, 970 (1969).
91. Chen, G. S. y Segel, I. H., Arch. Bioch. Bioph. *127*, 164 (1968).
92. Walker, G. J., Bioch. J. *94*, 289 (1965).
93. Chambost, J. P., Favard, A. y Cattanéo, J., Bull. Soc. Ch. Biol. *49*, 1231 (1967).

EL GLUCOGENO PARTICULADO

METABOLISMO - ESTRUCTURA - SINTESIS

ARMANDO JOSE PARODI *

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, « Fundación Campomar »
y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

RESUMEN

Se describen distintos métodos de extracción del glucógeno y su relación con el Peso Molecular del polisacárido. Se informa sobre las variaciones en la distribución de Pesos Moleculares del glucógeno con distintas condiciones fisiológicas de los organismos. Se describe la síntesis « in vitro » de glucógeno de alto Peso Molecular (glucógeno particulado) a partir de Glucosa-1-Fosfato o de Uridina-difosfato-glucosa usando como enzimas a la fosforilasa o a la glucógeno-sintetasa respectivamente. Se describen diversas propiedades del glucógeno nativo de hígado y de los distintos glucógenos sintéticos, como así también ciertas características de los mecanismos de síntesis « in vitro ».

1) *Método de extracción del glucógeno* [1] *- Su relación con el P. M.*

El P. M. de las preparaciones de glucógeno de diversos tejidos puede variar de acuerdo al método de extracción. El método usado más comúnmente es el descripto inicialmente por Pflüeger (1-2). Supone una digestión del tejido con álcali concentrado caliente. Otros

* Miembro de la carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investtgaciones Científicas y Técnicas. Argentina.

[1] *Abreviaturas :* gno : glucógeno ; gno-KOH : gno de bajo P. M. extraído por el método de Pflüeger (1) (2) ; gno-nat : gno particulado nativo de hígado, extraído por métodos suaves ; gno-G-1-P y gno-UDPG : gnos sintetizados *in vitro* usando fosforilasa y G-1-P o gno sintetasa y UDPG respectivamente.

G-1-P : glucosa-1-fosfato ; UDPG : uridina difosfato glucosa ; P. M. : Peso Molecular ; S : Coeficiente de sedimentación (Svedberg).

métodos son los que utilizan ácido tricloracítico frío [3], o caliente [4]; agua caliente [5-7] o agua caliente más hidrato de cloral [8]. El tamaño de las moléculas de glucógeno obtenidas es diferente para los distintos métodos, pero todos ellos dan P.M. menores de los que existen *in vivo* en ciertos tejidos. Lazarow [9, 10] usando extracción con agua fría y centrifugación diferencial, obtuvo gno de hígado de cobayo de un P.M. mucho mayor que el obtenido por los procedimientos anteriores, todos muy drásticos.

Al gno de alto P.M. (puede llegar a más de 3.10^9 daltons) se lo denominó gno particulado ya que en centrifugaciones diferenciales sedimenta con las partículas celulares. Como el contenido proteico de las preparaciones de Lazarow era alto (aproximadamente 1 % en peso respecto a gno) se creyó que este alto P.M. se debía a un agregado formado entre las proteínas y el gno. Orrell y Bueding [11, 12, 13] purificaron gno de diversos invertebrados (*Ascaris lumbricoides*) (*Hymenolepis diminuta*) y de hígado de conejo, homogeneizando el tejido con agua o buffer glicilglicina (pH 10,4) fríos, y cloroformo, tratando posteriormente las muestras con mezclas de cloroformo y octanol. Este procedimiento dio un glucógeno casi totalmente libre de proteínas, que poseía un alto P.M. Este no varió al tratar a las muestras con urea 8 M (1 semana a 0° C ó 25° C) guanidina 6 M (48 horas a 0° C ó 25° C); bromuro de litio 8 M o con diversos detergentes como Tween 80 1 % (24 horas); dodecil sulfato de sodio 1 % (24 horas). Tampoco se modificó el P.M. por repetidos congelamientos y descongelamientos ni por pasaje por carbón activado ni por tratamiento con diversas proteasas y ribonucleasas [14, 15]. El P.M. disminuyó por tratamiento a pH extremos o por calentamiento aún a pH neutros.

Estos resultados llevaron a los autores a la conclusión de que el gno particulado no era un artificio debido a agregación producida por proteínas, ácidos nucleicos ni uniones hidrógeno o electrostáticas y que el P.M. del gno extraído por métodos suaves es el que verdaderamente posee el polisacárido en el organismo.

Posteriormente se han descrito otros métodos para extraer glucógeno sin cambio de su P.M. [16, 17, 18, 19, 20]. Se ha encontrado gno particulado en hígado de mamíferos y en diversos invertebrados [14]. El gno de músculo esquelético humano, de rata o de conejo, no es particulado sino que tiene un P.M. pequeño (aproximadamente 10^7 daltons) [14, 21, 22]. El de tejido adiposo de rata tampoco es particulado (P.M. 15.10^7 daltons) [23]. Revel [24] cita trabajos de diver-

sos autores donde se dan los tamaños de los gnos de distintos tejidos y organismos vistos al microscopio electrónico. No se conoce el P.M. real del gno de bacterias y levaduras ya que los métodos de ruptura de las células son lo suficientemente drásticos como para romper las moléculas de gno. (Ver distribuciones de P.M. de gno de hígado y músculo en la figura 1).

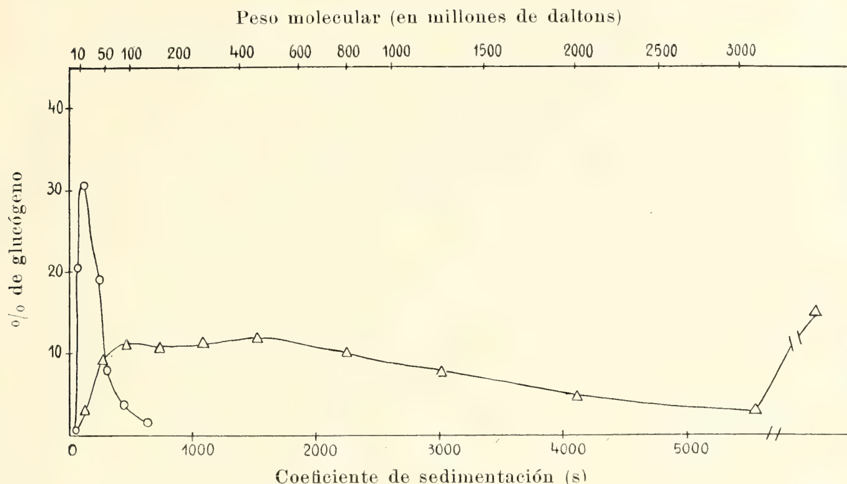


Fig. 1. — Distribuciones de P. M. de gno nativo de hígado (△) y músculo (○) Ver referencias (16) (22) y (46)

2) *Estructura del gno particulado*

Drochmans ([25]), usando un método de extracción parecido al de Lazarow, obtuvo gno particulado de hígado de rata y al observarlo al microscopio distinguió tres tipos de partículas. Las de mayor tamaño, llamadas α, revelaron tener un diámetro de 60 a 200 mμ. Están compuestas por subpartículas, llamadas β de diámetro 20-30 mμ. Drochmans distingue aún otras partículas, las γ, que estarían dentro de las β y cuyas dimensiones serían 3 mμ de ancho por 20 mμ de largo.

Laskov y Gross ([26]) usando "shadow casting" en el microscopio electrónico dan medidas menores para las partícsulas β: 10-14 mμ de ancho por 7 mμ de alto. Atribuyen esta diferencia a que el método usado por Drochmans para preparar las muestras a ser vistas en el microscopio electrónico (secado a temperatura ambiente) achataria al gno, mientras que el método por ellos usado (congelamiento y liofilización) obviaría dicho problema. Además Laskov

y Gross niegan la existencia de las partículas γ y atribuyen lo visto por Drochmans a "granulamiento" del fondo.

Barber *et al.* [18] usando técnicas parecidas a las de Drochmans dan para las partículas β un diámetro de 20-25 mμ. Estos autores admiten la existencia de las partículas γ pero ,según ellos, no tendrían forma cilíndrica sino redonda, con un diámetro de 2,5 a 3,5 mμ.

Según Minio *et al.* [27] tanto el tamaño de las partículas como la visión o no de las γ estaría condicionado por el método de preparación de las muestras empleado.

De los resultados comunicados por Mordoh *et al.* [16] se puede deducir que las partículas β tienen un P.M. promedio de 3,3 millones de daltons (medido por velocidad de sedimentación en gradientes de sacarosa).

Las observaciones arriba mencionadas han sido hechas sobre gno aislado del tejido por métodos suaves. Las realizadas sobre cortes de hígado directamente han dado los mismos resultados, al menos en cuanto a la existencia de las partículas α y β, confirmando así que *in vivo* el gno se encuentra en el hígado formando grandes moléculas compuestas de subpartículas [24, 27, 28].

La estructura "primaria" universalmente aceptada para el gno (ver el artículo de Krisman, Algranati y Goldenberg en este mismo volumen) supone una limitación teórica al P.M. En efecto, a medida que nos alejamos del centro (extremo reductor de la molécula) aumenta la densidad de grupos glucosídicos. Según French [29] cada resto de glucosa posee un volumen de 200 Å^3. El número de glucosas contenida en una esfera de radio r será:

$$\frac{\frac{4}{3}\Pi r^3}{200 \text{ Å}^3}$$

Este número estará limitado por la cantidad de glucosas cuyas secciones cubran la superficie total de dicha esfera. Si aceptamos un largo de cadena ($\overline{\text{C L}}$) de 12 será entonces:

$$\frac{\frac{4}{3}\Pi r^3}{200 \text{ Å}^3} < \frac{4\,\Pi r^2}{40 \text{ Å}^2} \cdot 12 \qquad ; \; r \leq 180 \text{ Å}$$

El número total de glucosas que entran en dicha esfera es 122.000 (P.M. 20.10^6 daltons).

Este cálculo se hizo suponiendo que las glucosas no están hidratadas. Si están hidratadas, el número de glucosas se reduce a 24.000-61.000 (P.M. 4-10 10^6 daltons) ya que la sección de cada glucosa aumenta de 2 a 5 veces. Es decir que teóricamente por encima de este tamaño no es posible un crecimiento con una estructura regularmente ramificada ([30]). Pollard llegó a las mismas conclusiones por razonamientos parecidos.

3) *Localización del gno en las células hepática y muscular*

En hígado de mamíferos, el gno particulado está localizado en la zona de retículo endoplásmico liso ([31, 32, 33]). Se ha supuesto que este retículo está relacionado de alguna manera con el proceso glucogenolítico, pero esto no ha sido bien aclarado aún ([34]).

Las enzimas gluco y glucogenolíticas que se encuentran unidas al retículo endoplásmico son la glucosa-6-fosfatasa ([35]) y alfa-amilasa ([36]). En el músculo esquelético, la mayoría del gno, está en el retículo sarcoplasmático y un poco en las miofibrillas ([37]).

4) *El P.M. del gno particulado en distintos estados fisiológicos*

Bueding y Orrell ([12]) encontraron que el gno de *Fasciola hepatica* tenía dos fracciones de distinto P. M., una de aproximadamente 100 S y otra de 1.000 S. Cuando los gusanos se ayunaban, desaparecía la fracción pesada que volvía a aparecer al realimentarlos con glucosa. En *Hymenolepis diminuta* ([38]) a pesar de que la proporción relativa de las dos fracciones no cambiaba con grandes variaciones en el contenido de gno, el P.M. medio de ellas revelaba un aumento o disminución paralela al contenido total de gno.

En el hígado de rata, Mordoh *et al.* ([16]) encontraron distribuciones de P.M. variables pero no hallaron los factores que las determinan.

Bueding *et al.* ([21]) encontraron diferentes distribuciones de P.M. en muestras de gno de hígado de pacientes afectados por distintas glucogenosis (enfermedades debidas a carencia total o parcial de alguna de las enzimas que intervienen directa o indirectamente en el metabolismo del gno ([39])) y concluyeron que son características para cada tipo de glucogenosis.

Parodi ([40]) estudió la posible influencia que pudiesen tener en la distribución de P.M. del gno particulado hepático de ratones, distintos factores que modifican el contenido total de gno.

Como agentes glucogenolíticos estudió: ayuno, isquemia, inyección de epinefrina, glucagón e insulina. Encontró que si bien estos agentes disminuyen el contenido de gno, el P.M. de éste sufre sólo una muy ligera disminución. Como agentes glucogenogénicos estudió: administración de glucosa e hidrocortisona. En el primer caso la distribución de P.M. no experimentó prácticamente ninguna variación con grandes aumentos en el contenido de gno. Lo que realmente aumenta es el número de moléculas y no el P.M. de éstas. En el segundo caso (hidrocortisona), comprobó que el gno sintetizado gluconeogénicamente por influencia de esta hormona no difiere en cuanto a su P.M. del de un animal con alimentación normal y no inyectado con hidrocortisona. Tampoco influye en el P.M. del gno particulado la administración de hormona de crecimiento bovina ni de distintos monosacáridos (glucosa, fructosa o galactosa) como precursores del polisacárido. Parodi explica parte de estos resultados tanto por las propiedades de las enzimas que se supone actúan *in vivo* en la síntesis y degradación del gno, como así también por la localización de éste en el hepatocito y en el lobulillo hepático.

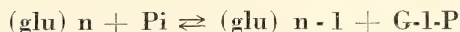
5) *Síntesis "in vitro" de gno particulado a partir de G - 1-P*

Si bien los trabajos de Orrell y Bueding ([11-15]) sugerían que las partículas α del gno particulado no eran agregados de moléculas más pequeñas causados por proteínas, ácidos nucleicos, uniones hidrógeno o electrostáticos, no se poseía una clara confirmación de este hecho.

Para tratar de obtenerla y ver además si el gno particulado poseía solamente las uniones glucosídicas clásicamente descriptas para el polisacárido, esto es α 1-4 y α 1-6, Mordoh *et al.* ([41]) decidieron intentar la síntesis *in vitro* de gno particulado. Se supuso que partiendo de un cociente alto dador (G-1-P) aceptor (gno primer), el producto debería ser de alto PM. Si bien *in vivo* el mecanismo de síntesis es vía UDPG y gno-sintetasa [2], se utilizó *in vitro* la inversión de la vía normal de degradación, esto es G-1-P y fosforilasa ya que esta última enzima se puede obtener en forma cristalina.

[2] Enzimas: Gno sintetasa: Uridina difosfato glucosa: α-1,4-glucan α-1-glucosiltransferasa E. C. 2.4.1.11. Fosforilasa: α-1,4-glucan: Ortofosfato glucosil transferasa EC 2.4.1.1. Enzima ramificante: α 1,4-glucan: α 1,4 glucan 6-glucosil transferasa E. C. 2.4.1.18.

Recordemos que la reacción



$$(glu)\ n + Pi \rightleftarrows (glu)\ n - 1 + G\text{-}1\text{-}P$$

es reversible y funciona en el sentido de la síntesis a cocientes $\frac{G\text{-}1\text{-}P}{Pi}$ altos. Por otra parte se sabía que distintos oligo y polisacáridos actúan como "Primers" con la misma especificidad respecto de la fosforilasa y gno sintetasa (42).

De esta manera, colocando en un tubo de ensayo G-1-P, fosforilasa *b* de músculo cristalina y enzima ramificante de hígado parcialmente purificada (pues de lo contrario se obtiene un producto no ramificado parecido a la amilosa), fue posible sintetizar *in vitro* un gno de muy ato P.M.

Las preparaciones de G-1-P comerciales que se emplearon contienen trazas de oligo y polisacáridos que actuaron como "primers" en la reacción de síntesis. El P.M. final del gno G-1-P resultó tener una relación inversa con la cantidad de "primer" inicialmente presente. Así, si se añadía gno-KOH al principio de la reacción, el P.M. del producto era menor.

Por otra parte se obtuvo gno G-1-P del mismo P.M. con una mezcla de reacción diluida que con una concentrada, lo que demuestra que las moléculas de gno no están formadas por enredamiento de moléculas más pequeñas durante el crecimiento.

La microscopía electrónica reveló que el gno G-1-P está formado por partículas α de 90-100 mμ de diámetro con subpartículas β de 14-25 mμ. Similares dimensiones se encontraron para el gno-nat. No existe límite al crecimiento de las moléculas ya que éstas, una vez aisladas pudieron, al reincubarse con la mezcla de reacción sintetizante, alcanzar diámetros de 380 mμ, sin variar aparentemente el tamaño de las partículas β.

Estos resultados sugirieron, dada la pureza de las enzimas y sustratos empleados, que el gno G-1-P y por ende el gno-nat. están únicamente formados por uniones glucosídicas α 1-4 y α 1-6.

Para salvar el impedimento teórico de alcanzar P.M. mayores de 4-10 millones de daltons, Mordoh *et al.* supusieron que una vez que se llegaba a dicho tamaño crítico, la fosforilasa (o la gno sintetasa *in vivo*) alargaban exageradamente una rama dando origen así a la formación de una nueva subpartícula.

6) *Características distintas del gno G-1-P y del gno-nat*

Tal como se dijo anteriormente, el gno particulado nativo es extremadamente lábil a pH extremos, aún a bajas temperaturas. Inicialmente Mordoh *et al.* ([41]) atribuyeron dicha labilidad a las "ramas largas" mencionadas más arriba, que unirían entre sí a las subpartículas. Estas ramas tendrían las uniones α 1-4 más lábiles debido a la tensión producida por la agitación térmica de las subpartículas.

Sin embargo, en un trabajo posterior, los mismos autores encontraron que el gno-G-1-P es mucho menos lábil al ácido que el gnonat ([16]).

La acción de diversos agentes sobre el gno se puede detectar midiendo la distribución de P.M. del polisacárido en gradientes de sacarosa o bien espectrofotométircamente midiendo la turbidez a 500 mμ. La turbidez por unidad de peso es proporcional al Peso Molecular Peso Promedio, para materiales polidispersos como el gno ([43]).

En la figura 2 se ve la variación en los coeficientes de sedimentación de gno G-1-P y de gno-nat. producida por Cl H 0,09 N a 37° C.

En la figura 3 se ven los correspondientes cambios de absorbancia a 500 mμ. El gno-nat resultó ser más lábil que el gno G-1-P no sólo a pH ácido sino también a pH alcalinos (Na OH 1N, 20° C) o aún a pH neutros pero a 100° C.

De la figura 2 surge que no sólo la labilidad en medio ácido es distinta para los dos gnos sino que también el mecanismo de ruptura es diferente.

En el gno sintético se observa en todo momento una sola población cuyo P.M. va disminuyendo con el tiempo, es decir como si las moléculas del polisacárido se fuesen rompiendo por mitades.

En cambio en el gno-nat se tienen en los primeros momento dos poblaciones, una liviana de S = 100 (P.M. 8.10^6 daltons) y otra pesada. La cantidad de gno en la primera va aumentando con el tiempo de tratamiento, a expensas de la segunda, cuyo P.M. va disminuyendo y que luego desaparece.

Posteriormente se comprobó que a pH alcalinos o a pH neutros pero a 100° C, el gno-G-1-P y el gno-nat se descomponen por un mecanismo similar a sus respectivos mecanismos de degradación ácida ([22]).

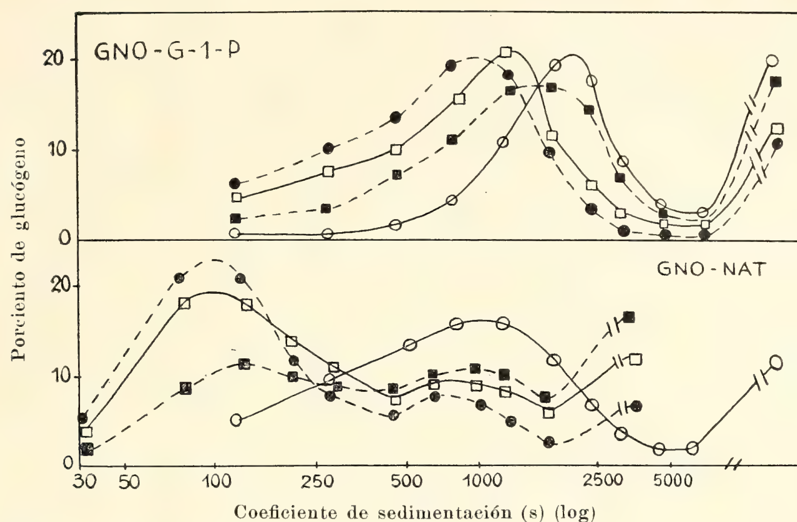


Fig. 2 — Acción del ácido sobre el gno-nat y gno-G-1-P. Variaciones en el P. M. Las muestras fueron incubadas a 37°C en ClH 0,09 N por los siguientes tiempos ; ○ control ; ■ 1,1/2 minuto ; □ 10 minutos ; ● 30 minutos. Las abscisas están en escala logarítmica. Tomado de (16).

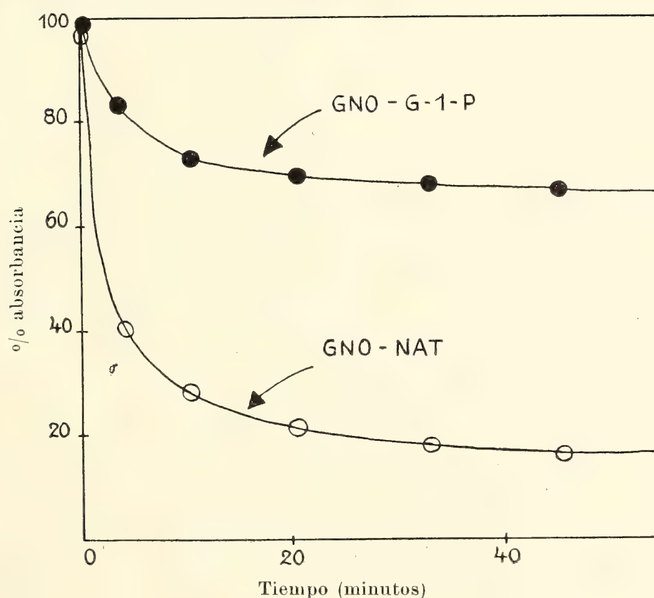


Fig. 3. — Acción del ácido sobre el gno-nat y gno-G-1P. Cambios en turbidez. Las muestras fueron incubados a temperatura ambiente en ClH 0,09 N. Tomado (16).

Observaciones al microscopio electrónico revelaron que la población de S = 100 está compuesta en promedio por 2,4 subpartículas β.

Debido a estos resultados, Mordoh *et al.* ([16]) postularon la existencia en el gno-nat de ciertas uniones más lábiles que las comunes glucosídicas α 1-4 y α 1-6.

Estas "uniones lábiles" estarían en proporción de 1 en 50.000 de las restantes, es decir uniendo partículas de P.M. 8.10^6 daltons.

Es necesario hacer notar la similitud entre el P.M. de estas partículas y el P.M. teórico máximo alcanzable.

Parodi *et al.* ([2]) encontraron que si bien el gno-nat es más lábil que el gno G-1-P, ambos presentan una curva de estabilidad *versus* pH similar.

Además el tetraborato de Na y los iones cúprico y férrico aceleran la descomposición de ambos gnos.

Esto hacía suponer que la "unión lábil" del gno-nat era de naturaleza glucosídica, admitiendo que el gno-G-1-P sólo posee dicho tipo de uniones.

Esta labilidad está relacionada evidentemente al peso de las partículas que une dicha unión lábil, ya que una dextrina de β amilasa de gno resultó ser mucho menos lábil que un gno de igual P.M.

La dextrina, sin embargo, se descompone bajo la acción del ClH por un mecanismo similar al gno-nat.

Nuevas observaciones al microscopio electrónico realizadas colocando en la misma grilla una mezcla de gno-nat pesado y gno-G-1-P liviano o la mezcla inversa, para poder identificarlos claramente en las fotografías, revelaron ciertas diferencias entre ambos gnos. El gno-nat resultó tener una estructura menos compacta con las subpartículas β mejor definidas que el sintético. Esto sugería que las partículas de S = 100 podrían estar unidas en el gno-nat por cadenas relativamente largas, lo que daría una estructura parecida a un racimo de uvas. La ruptura ocurriría entonces preferentemente en estas largas cadenas interconectantes.

Una observación aparentemente contraria a este último modelo es el efecto de la sonicación.

Podría esperarse que ésta, al aumentar la velocidad de vibración interna de las moléculas, rompiese las uniones entre las partículas de S = 100.

Sin embargo, el mecanismo de ruptura por sonicación del gno-nat y del gno-G-1-P resultó igual. Este mecanismo es similar al de

descomposición ácida del gno-nat pero el pico de menor P.M. no tiene un S = 100 sino que es relativamente polidisperso y su P.M. disminuye gradualmente con el tiempo.

Se comprobó además que la sonicación y el ácido rompen uniones distintas.

7) *Síntesis "in vitro" de gno particulado a partir de UDPG.*

Una confirmación de que la unión lábil es de naturaleza glucosídica α 1-4 ó α 1-6 se obtuvo al sintetizar Parodi *et al.* ([44]) gno particulado *in vitro* a partir de UDPG usando como enzimas a la gno sintetasa y la ramificante, ambas de hígado y parcialmente purificadas.

El gno-UDPG resultó ser igual de lábil que el gno-nat en medio ácido y alcalino. Además el mecanismo de degradación es similar y por lo tanto marcadamente distinto al del gno-G-1-P.

Este resultado confirma que la unión lábil es una unión glucosídica α 1-4 (ó α 1-6).

La labilidad debe ser debida entonces a un factor estructural aún no determinado.

Por otra parte, la similitud en el comportamiento de los gno-nat y gno-UDPG con respecto a la acción del ácido y álcali y su diferencia con el del gno-G-1-P ofrece una prueba directa de que *in vivo* el gno es sintetizado vía UDPG y no vía G-1-P.

Dos resultados un tanto inesperados al estudiar la síntesis del gno-UDPG fueron los siguientes: *a*) Para la misma cantidad de síntesis de gno-UDPG, el polisacárido sintetizado en una mezcla de incubación diluida es más pesado que uno sintetizado en una mezcla concentrada.

b) Al sintetizar igual cantidad de gno-UDPG y gno-GIP en mezclas de incubación similares (salvo que una contiene UDPG y la otra G-1-P), el P.M. del primero resultó ser muy superior al del segundo. Se descartó que esto se deba a posible primer contaminante de la G-1-P.

Estos resultados alentaron un estudio más detallado del proceso de síntesis de ambos gnos sintéticos.

8) Mecanismo de síntesis "in vitro" de gno particulado

Al seguir el P.M. de ambos gnos sintéticos con el transcurso del tiempo de síntesis, se encontraron marcadas diferencias ([45]).

En la figura 4 se observa que el gno-G-1-P presenta en todo momento una sola población cuyo P.M. va aumentando paralelamente a la cantidad de gno sintetizado.

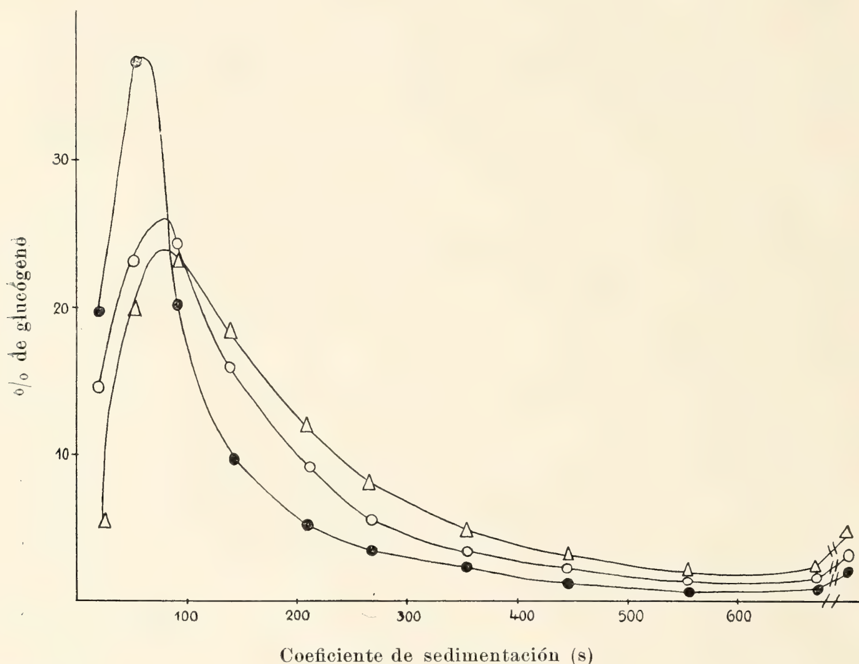


Fig. 4. — Cambios en la distribución de P. M. de gno-C-1-P durante la síntesis. Alícuotas tomadas luego de 5 (●) ; 60 (○) y 165 (△) minutos de síntesis. Tomado de (45).

El resultado con el gno-UDPG es distinto al anterior. Como se ve en la figura 5, de una única población inicial liviana, se obtienen luego de cierto tiempo de síntesis, dos poblaciones: la inicial, cuyo P.M. aumenta levemente durante la síntesis y otra mucho más pesada, inicialmente inexistente.

Al graficar la variación de la cantidad de gno en la fracción liviana ($S \leq 265$) y pesada ($S \geq 265$), se obtuvieron los resultados de la figura 6. La cantidad de gno de menor P. M. llega a valores cons-

tantes a los 60 minutos de incubación, a pesar de que por otras experimentos se dedujo que el P.M. del gno no influye en su capacidad aceptora.

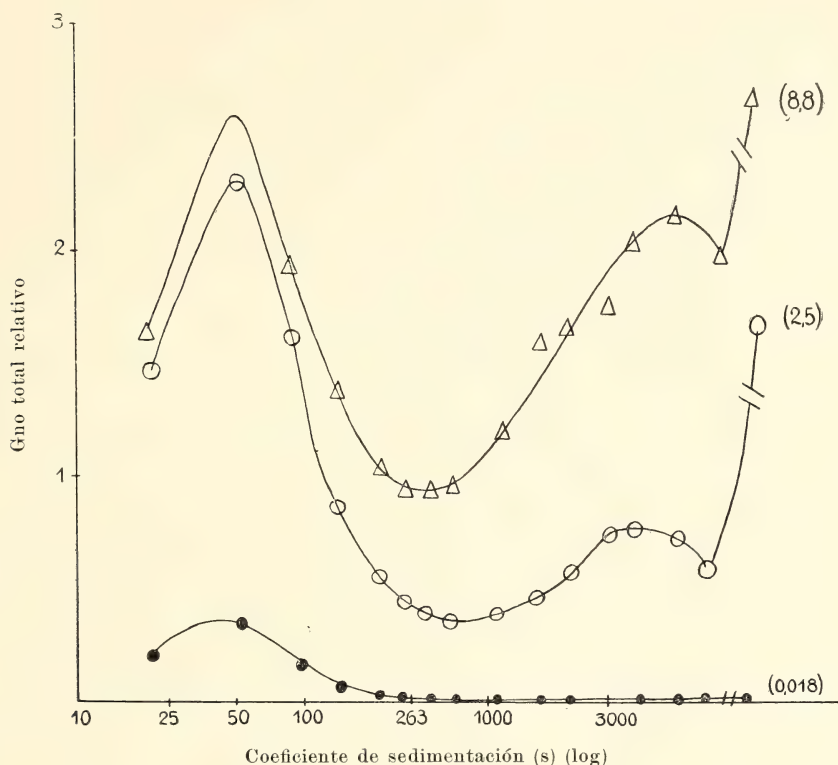


Fig. 5. — Cambios en la distribución de P. M. de gno-UDPG durante la síntesis. Alícuotas tomada luego de 5 (●); 60 (○) y 165 (△) minutos de incubación. Las abscisas están en escala logarítmica. En ordenadas se representan las cantidades relativas totales sintetizadas. La cantidad total sintetizada durante los primeros 5 minutos de incubación se tomó como 1. Tomado de (45).

La cantidad de gno de mayor P.M. aumenta casi linealmente, a partir de los 10 minutos, hasta los 165 minutos de incubación.

Estos resultados se podrían explicar admitiendo una hipotética unión entre las moléculas de gno-UDPG de bajo P.M., que pasarían así a formar parte de la fracción más pesada.

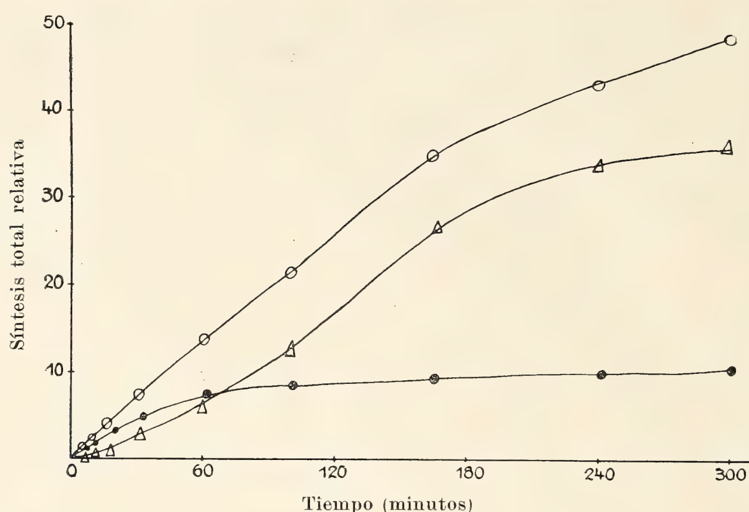


Fig. 6. — Cambios en las cantidades de gno-UDPG liviano y pesado durante las síntesis. Cantidad total de gno UDPG (○). Cantidad en el pico liviano (S $<$ 263) (●). Cantidad en el pico pesado (S $>$ 263) (△). La síntesis total durante los primeros 5 minutos de incubación se tomó como 1.

9) *Síntesis "in vitro" de gno particulado usando gno sintetasa de músculo*

Tal como se dijo anteriormente, el gno de músculo esquelético de rata no es particulado sino que posee un P.M. relativamente pequeño (8-10 . 10^6 daltons).

Krisman y Parodi ([46]) sintetizaron *in vitro* gno a partir de UDPG usando como enzima transferente a la gno sintetasa de músculo.

El producto así obtenido reveló ser de un P.M. sólo levemente mayor al del polisacárido que se extrae de dicho tejido. Sin embargo, luego de conservar a la preparación enzimática a $-20°$ C durante varias semanas, la gno sintetasa muscular no perdió actividad pero el nuevo producto de síntesis que dio fue gno-UDPG particulado, indistinguible del sintetizado por la enzima hepática, tanto por su distribución de P.M. como por la labilidad ácida y su mecanismo de degradación en dichas condiciones.

Al aumentar la fuerza iónica en las mezclas de incubación por el agregado de sales, el gno UDPG sintetizado por la gno sintetasa muscular envejecida, resultó ser de bajo P.M. El efecto de altas fuerzas iónicas sobre el P.M. del producto sintetizado por la gno sintetasa hepática es menor, pero explica la diferencia de tamaño

entre gnos-UDPG sinetizados en mezclas de incubación concentradas y diluidas.

La variación de P.M. del gno-UDPG durante la síntesis por la gno-sintetasa muscular envejecida resultó similar a la de la enzima de hígado (fig. 5). Con alta fuerza iónica, el resultado fue similar al de la fosforilasa, es decir, una sola población en todo momento, cuyo P.M. aumenta con el tiempo de síntesis (fig. 4).

Una explicación posible de estos resultados es que el hipotético mecanismo agregador de moléculas de bajo P.M., mencionado más arriba como una posibilidad, se encuentra inactivo en la enzima muscular fresca, a semejanza de lo que ocurre *in vivo*, pero se activa con el envejecimiento de la preparación enzimática. A su vez, altas fuerzas iónicas lo volverían al estado inactivo. Pero esto es sólo una hipótesis.

BIBLIOGRAFIA

1. Pflüeger, E. F. W., Arch. Gen. Physiol., *131*, 201 (1910).
2. Hassid, W. Z. y Abraham, S., Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), Academic Press, New York, Vol. III, Pag. 37 (1957).
3. Stetten, M. R., Katzen, H. M. y Stetten, D., J. Biol. Chem., *222*, 587 (1956).
4. Sahyum, M. y Alsberg, C. L., J. Biol. Chem., *89*, 33 (1930).
5. Greenwood, C. T. y Manners, D. Y., Proc. Chem. Soc., 26 (1957).
6. Bell, D. J. y Young, F. G., Biochem. J., *28*, 882 (1934).
7. Petree, L. G. y Alsberg, C. L., J. Biol. Chem., *82*, 385 (1929).
8. Meyer, K. H. y Jeanloz, R. W., Helv. Chem. Acta, *26*, 1784 (1943).
9. Lazarow, A., Anat. Records, *84*, 31 (1942).
10. — Arch. Biochem. Biophys., *7*, 337 (1945).
11. Orrell, S. A. y Bueding, E., J. Am. Chem. Soc., *80*, 3800 (1958).
12. Bueding, F. y Orrell, S. A., J. Biol. Chem., *236*, 2854 (1961).
13. — J. Biol. Chem., *239*, 4018 (1964).
14. Orrell, S. A., Bueding, E. y Reissig, M., *On control of glycogen metabolism*, CIBA Foundation Symposium (W. J. Whelan y M. P. Cameron eds.), Churchill Ltd. London, pag. 29 (1964).
15. Orrell, S. A. y Bueding, E., J. Biol. Chem., *239*, 4021 (1964).
16. Mordoh, J., Krisman, C. R. y Leloir, L. F., Arch. Biochem. Biophys., *113*, 265 (1966).
17. Laskov, R. y Margoliash, E., Bull. Res. Counc. Israel Sect. A, *11*, 351 (1963).
18. Barber, A. A., Harris, W. E. y Anderson, N. G., Nat. Cancer Inst. Monog., *21*, 285 (1966).
19. Whistler, R. L. y Be Miller, J. N., Arch. Biochem. Biophys., *98*, 120 (1962).
20. Dever, A., O'Brien Barichievich, R. y Didiqui, B., Anal. Biochem., *14*, 237 (1966).
21 Bueding, E., Orrell, S. A. y Sidbury, J., *On control of glycogen metabolism*,

CIBA Foundation Symposium (W. J. Whelan y M. P. Cameron eds.), Churchill Lt. London, pag. 387 (1964).
22. Parodi, A. J., Krisman, C. R., Leloir, L. F. y Mordoh, J., Arch. Biochem. Biophys., *121*, 769 (1967).
23. Gutman, A., Schramm, H. y Shafrin, E., Israel J. Med. Sci., *3*, 427 (1967).
24. Revel, J. P., J. Histochem. Cytochem., *12*, 104 (1964).
25. Drochmans, P. J., J. Ultrastruc. Res., *6*, 141 (1962).
26. Laskov, R. y Cross, J., Israel J. M. Sci., *1*, 26 (1965).
27. Minio, F., Lombardi, L. y Gantier, A., J. Ultrastruc. Res., *16*, 339 (1966).
28. Karrer, H. E., J. Ultrastruc. Res., *5*, 116 (1961).
29. French, D., *On control of glycogen metabolism*, CIBA Foundation Symposium (W. J. Whelan y M. P. Cameron eds.), Churchill Ltd. London, pag. 29 (1964).
30. Pollard, E. C., *Polysaccharides in Biology* (G. F. Springer ed., New York. The Josiah Macy Foundation, pag. 219 (1957).
31. Porter, K. R. y Bruni, C., Cancer Res., *19*, 997 (1959).
32. De Man, J. C. H. y Block, A. P., J. Histochem. Cytochem., *14*, 135 (1966).
33. Jones, A. L. y Fawcett, D. M., J. Histochem. Cytochem., *14*, 215 (1966).
34. Peters, V. B., Kelly, G. W. y Dembitzer, H. M., Ann. N. Y. Acad. Sci., *111*, 87 (1963).
35. Rosen, S. I., Kelly, G. W. y Peters, V. B., Science, *152*, 352 (1966).
36. Mordoh, J., Krisman, C. R., Parodi, A. J. y Leloir, L. F., Arch. Biochem. Bioahys., *127*, 193 (1968).
37. Rosati, G., J. Ultrastruc. Res., *18*, 444 (1967).
38. Orrell, S. A., Bueding, E. y Colucci, A. V., Comp. Biochem. and Physiol., *18*, 657 (1966).
39. Stacey, M. y Barber, S. A., *Carbohydrates of living tissues* (D. Van Nostrand ed.), London, pag. 27 (1962).
40. Parodi, A. J., Arch. Biochem. Biophys., *120*, 547 (1967).
41 Mordoh, J., Leloir, L. F. y Krisman, C. R., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., *53*, 86 (1965).
42. Goldemberg, S. H., Biochim. Biophys. Acta, *56*, 357 (1962).
43. Horton, O. y Wolfrom, M. L., Comprehensive Biochemistry (M. Florkin and E. H. Stoltz, eds.), Vol. 5, p. 189. Elsevier, Amsterdam (1963).
44. Parodi, A. J., Mordoh, J., Krisman, C. R. y Leloir, L. F., Arch. Biochem. Biophys., *132*, 111 (1969).
45. Parodi, A. J., Krisman, C. R. y Mordoh, J., Arch. Biochem. Biophys., *141*, 219 (1970).
46. Krisman, C. R. y Parodi, A. J., Arch. Biochem. Biophys., *141*, 228 (1970).

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL GLUCOGENO EN MAMIFEROS

Por ROMANO PIRAS

Instituto de Investigaciones Bioquímicas « Fundación Campomar »

RESUMEN

La síntesis del glucógeno *in vivo* es regulada a través de la GS por hormonas y metabolitos. Estos actúan interaccionando con la enzima propiamente dicha (comportamiento alostérico, cambios de estado de agregación, cambios en el estado de asociación al glucógeno), o bien sobre las enzimas que catalizan las interconversiones de las dos formas de GS. Algunos de estos factores actúan de una manera complementaria a los diferentes niveles señalados, obteniéndose así una regulación más segura y delicada. Por otra parte, una variedad de estos factores actúan, en general, sobre la GF en un sentido opuesto. De esta manera el resultado neto ante estímulos fisiológicos es doblemente efectivo, dado que mientras se activa un sistema (por ej., síntesis) se inactiva el otro (por ej., degradación).

El glucógeno constituye la principal fuente de reservas hidrocarbonadas de los organismos superiores. La biosíntesis requiere varias etapas hasta la formación del UDP-glucosa, compuesto que en definitiva actúa transfiriendo su resto glucosilo a moléculas de polisacárido para formar nuevas uniones α-1,4 y agrandar de esta forma la molécula del glucógeno (1). Dada la naturaleza de esta reacción, la enzima que la cataliza se conoce con el nombre trivial de glucógeno sintetasa [1].

De la secuencia de reacciones que llevan a la formación del polisacárido; la etapa catalizada por la GS es limitante (2) y por lo tanto es una etapa adecuada (3) para que se ejerza el control de la biosíntesis del glucógeno.

La GS es una proteína de alto peso molecular, está generalmente

[1] Abreviaturas utilizadas: GS, glucógeno sintetasa; GF, glucógeno fosforilasa.

asociada al glucógeno y puede existir en dos formas enzimáticas (4). Cada una de estas características de la GS permitiría ser eventualmente utilizada para regular su actividad. En efecto:

a) La interconversión entre dos formas enzimáticas, una más activa (GS-I) que la otra (GS-D), sugiere la posibilidad de regulación (hormonal, neuronal, por metabolitos) a nivel de las interconversiones.

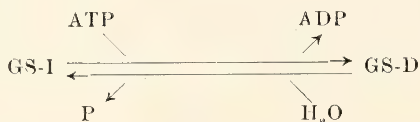
b) Cada una de las formas podría variar su actividad ante efectores, dado que su peso molecular sugiere la posibilidad de subunidades que interactúen.

c) El estado de asociación entre enzima y polisacárido sugiere que esta etapa también puede ser regulada.

La existencia de alguno de estos mecanismos no excluye los otros, de manera que de existir todos se tendría un sistema que permitiría una adecuada y muy fina regulación de la síntesis del glucógeno. La investigación de estos diferentes aspectos ha sido motivo de nuestro trabajo en los últimos años y a continuación se describirán los aspectos más salientes encontrados.

a) Regulación a nivel de las interconversiones de GS.

En aquellos sistemas investigados con cierta profundidad (5-10) se ha encontrado que la GS existe en dos formas: una que es activa por sí misma, GS-independiente (GS-I) y la otra que requiere la presencia de glucosa-6-P para ser activa, GS-dependiente (GS-D). Larner y colaboradores (5) fueron los primeros en señalar claramente la existencia de las dos formas en músculo de rata y demostraron que ambas son interconvertibles a través de las siguientes reacciones:



La conversión en forma D es catalizada por la GS-quinasa y la reacción inversa por la GS-fosfatasa. El equilibrio de esta reacción puede ser desplazado por factores que afecten a una o ambas enzimas, con el consecuente cambio en la proporción de GS-D y GS-I, y por ende de la actividad glucogenogénica. Estos factores pueden ser neuronales, hormonales o metabolitos.

1) *Neuronales.*

La contracción muscular activa de una manera muy rápida la GF, que vuelve a su forma inactiva al relajarse el músculo ([11]). La GS por su parte no responde inmediatamente a la contracción muscular, sino que recién cuando el músculo se ha relajado empieza a convertirse de la forma D a la I, alcanzándose el máximo a los 5 minutos de finalizada la contracción tetánica ([12]). Una actividad alta de GS y baja de fosforilasa después de una contracción es lo que se esperaría *a priori,* dado que el músculo debe recuperar la reserva de glucógeno que utilizó durante la contracción. Sin embargo, dado que los sistemas de GS y GF son antagónicos, no resultaba claro porque al producirse la contracción, si bien la GF aumentaba la GS no disminuía. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que el nivel de GS presente en reposo es el basal y que por lo tanto no puede disminuirse. Para observar el cambio en sentido contrario de las dos enzimas se deberá realizar el experimento en condiciones más adecuadas. Para ello se indujo la contracción muscular no sobre un músculo en reposo, sino sobre uno que había sido estimulado por 10 segundos 4 minutos antes: el segundo estímulo se produce en el momento en que la GS-I es máxima y la GF *a* mínima.

En estas condiciones la contracción muscular produce la conocida rápida transformación de GF *b* en *a*, pero además se observa una igualmente rápida conversión de GS-I en GS-D. De esta manera se demuestra que factores neuronales (Ca^{++} ?) pueden actuar sobre las conversiones de la GS y que los sistemas enzimáticos responsables de la síntesis y degradación del glucógeno actúan ante esta clase de estímulos de una manera coordinada y complementaria: mientras un sistema se activa el otro se desactiva y viceversa([13]).

2) *Hormonales*

La primera demostración de que una hormona puede afectar al sistema de la GS fue obtenida por Belocopitow ([14]) en diafragma de rata, utilizando adrenalina. Estudios posteriores en varios tejidos han confirmado que la adrenalina disminuye la actividad de GS, probablemente activando la GS-quinasa por intermedio del 3′-5′-AMP cíclico liberado por acción de la hormona sobre la adenilciclasa ([15]). El glucagón actuaría de una manera similar en aquellos tejidos que le son sensibles([16]). Se ha encontrado que la insulina en gene-

ral, tiene una acción antagónica a la de la adrenalina, o sea favorece la conversión de GS-D a GS-I ([15, 16]). El mecanismo de este efecto no está aún totalmente aclarado, pero cabe señalar que en la glándula adrenal, por ejemplo, parecería que la insulina aumenta la actividad de GS-fosfatasa.

La acción de la insulina en esta glándula es por demás paradójica, dado que posee un efecto glucogenolítico ([17]).

Los glucocorticoides, por su parte, cumplen un importante rol en la conversión de GS-D en GS-I en hígado ([18-20]). al mismo tiempo participan de alguna manera aún oscura en las conversiones de GF y GS *en músculo* ([21, 22]). En efecto, se ha encontrado que la conversión de GS-I en GS-D inducida por adrenalina es significantivamente menor en animales adrenalectomizados crónicos que en animales normales o adrenalectomizados que recibieron hidrocortisona o DOCA.

3) *Metabolitos*

La GS quinasa es estimulada por 3′-5′-AMP cíclico, de la misma manera que otras quinasas similares ([15, 23]). Por lo tanto los factores que tiendan a aumentar o disminuir este metabolito favorecerán o retardarán respectivamente, la conversión de GS-I en GS-D. La adrenalina, glucagon, quizás la insulina, la cafeína, teofilina, etc. entran dentro de esta clase de compuestos.

La GS fosfatasa, por su parte, se ha encontrado que es inhibida por glucógeno tanto en músculo ([24]), como en hígado ([19]) y adrenal ([25]). Este mecanismo sería una especie de "feedback" dado que al aumentar el glucógeno *in vivo* daría la señal para que se inhiba la actividad de la GS fosfatasa, o sea la enzima encargada de mantener un nivel alto de la forma más activa (I) de GS. Recientemente se ha encontrado trabajando en homogenatos de adrenal que la conversión de GS-D en GS-I puede ser regulada también por glucosa-6-P. En efecto, el glucosa-6-P estimula la conversión de GS-D en GS-I, especialmente cuando se lo utiliza en presencia de Ca^{++}. Esta combinación es además particularmente efectiva en revertir la inhibición por glucógeno ([25]).

b) Regulación por efectores.

En los párrafos anteriores se dio por sentado que la GS-I es enzimáticamente más activa que la forma-D; sin embargo este punto no estaba totalmente claro hasta hace relativamente poco tiempo. En efecto, si bien la GS-I es mucho más activa que la D en ausencia de glucosa-6-P (a concentraciones menores de 0.1 - 0.2 mM de éste), cuando la concentración del éster fosfórico se incrementa la diferencia de actividad tiende a desaparecer. *In vivo* el nivel de glucosa-6-P es de alrededor de 0.3 mM y en consecuencia la conversión de la forma D a la I resultaría en un incremento de actividad de un 30 %. Esta cifra es lo suficientemente exigua como para sospechar que sería extraño que un tejido necesite de una enzima en dos formas interconvertibles para obtener tan poca ganancia. Teniendo en cuenta una situación algo análoga estudiada por Morgan y Parmeggiani ([26]) para la GF y el 5'-AMP y los trabajos realizados con la GS de levadura ([27, 28]), se encontró que la GS de músculo de rata es inhibida por varios metabolitos: ATP, ADP, Pi, PCr ([29, 30]). Esta inhibición es del tipo alostérico y puede ser revertida por el glucosa-6-P, el efector positivo. La particularidad fisiológicamente más importante es que mientras la inhibición por ATP de la GS-I es revertida fácilmente aún a bajas concentraciones de glucosa-6-P, la inhibición de la forma D require niveles más altos del éster fosfórico. La consecuencia inmediata es que, a los niveles de glucosa-6-P presentes *in vivo*, la GS-D está casi totalmente inhibida, mientras la GS-I casi totalmente activa. Por lo tanto, en estas condiciones, hay una gran ganancia de actividad al producirse la conversión de GS-D en GS-I.

Estudios *in vivo* parecen confirmar la importancia de este mecanismo ([12]). Para ello se midieron los niveles de GS, substratos, efectores negativos y glucosa-6-P en diferentes condiciones fisiológicas del músculo (reposo, contracción y relajación) y se "reconstituyó" con estos datos el sistema *in vitro*. La actividad real existente *in vivo* se encontró que es semejante a la obtenida con el sistema reconstituido que incluye a los inhibidores, mientras que es diferente del que no los tiene. Este tipo de regulación fue estudiada también en glándula adrenal ([8]). Además ha sido descripta para otras fuentes y por lo tanto parece ser un mecanismo bastante general.

Las interacciones de tipo alostérico encontradas mediante los estudios cinéticos mencionados ([29, 30]) sugirieron la posibilidad que

la GS sufriera alteraciones en su estructura cuaternaria por acción de los efectores. Utilizando GS libre de glucógeno se ha encontrado que la enzima se agrega cuando están ocupados el sitio activo y el del efector positivo. Efectores negativos (ATP, ADP) o fuerza iónica pueden revertir este efecto ([31]).

c) Regulación por cambio de estado de asociación.

La GS está normalmente asociada al glucógeno, de la misma manera que varias de las otras enzimas que forman el complejo enzimático responsable de su síntesis y degradación ([32]). Sin embargo se ha encontrado que la estimulación eléctrica o la infusión de adrenalina producen *in vivo* una disociación muy rápida de la GS del glucógeno. La fosforilasa también se disocia, pero una vez terminada la estimulación la GS se reasocia casi instantáneamente mientras que la GF lo hace más lentamente. La diferencia relativa en las velocidades de disociación de la GS y GF durante la contracción y de reasociación una vez terminado el estímulo sugieren que la GF estaría presente preferentemente en la primera de las etapas (glucogenolísis), mientras que en la segunda (glucogenogénesis) estaría la GS ([33]).

Este mecanismo se sumaría por lo tanto a los anteriormente descriptos en prevenir la acción de una de las enzimas en momentos en que, desde el punto de vista fisiológico, es importante el funcionamiento de la otra. Estudios *in vitro* han demostrado además que la asociación de la GS al glucógeno es influenciada por diversos metabolitos, siendo el UDP-glucosa y el glucosa-6-P entre los más efectivos en facilitarla ([33]).

REFERENCIAS

1. Leloir, L. F., Proc. Plen. Session VI Intern. Congress Biochem. New York, 1964.
2. Villar-Palasí, C. y Larner, J., Arch. Biochem Biophys., *86*, 270 (1960).
3. Hales, C. N., en Essays in Biochemistry (P. N. Campbell y G. D. Greville, editores), Vol. 3, pag. 73, Academic Press, 1967.
4. Villar-Palasí, C., Rosell-Pérez, M., Hizukuri, S., Huijing, F. y Larner, J., Methods in Enzymol., *8*, 374 (1966).
5. Friedman, D. L. y Larner, J., Biochemistry, *2*, 669 (1963).
6. De Wulf, H. y Hers, H. G., Europ. J. Biochem., *6*, 552 (1968).
7. Larner, J., Villar-Palasí, C. y Brown, N. E., Biochim. Biophys. Acta, *178*, 470 (1969).

8. Piras, M. M., Bindstein, E. y Piras, R., Arch. Biochem. Biophys., *139*, 121 (1970).
9. Rothman-Denes, L. B. y Cabib, E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., *66*, 967 (1970).
10. Téllez-Iñón, M. T., Terenzi, H. y Torres, H. N., Biochim. Biophys. Acta, *191*, 765 (1969).
11. Danforth, W. H., Helmreich, E. y Cori, C. F., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., *48*, 1191 (1962).
12. Piras, R. y Staneloni, R., Biochemistry, *8*, 2153 (1969).
13. Staneloni, R. y Piras, R., Biochem. Biophys. Res. Commun., *36*, 1032 (1969).
14. Belocopitow, E., Arch. Biochem. Biophys., *93*, 457 (1961).
15. Larner, J., Trans. N. York Acad. Sci., *29*, 191 (1966).
16. Villar-Palasí, C., Vitamins and Hormones, *26*, 65 (1968).
17. Bindstein, E., Piras, R. y Piras, M. M., Endocrinology, *88*, 233 (1971).
18. De Wulf, H., Stalmans, W. y Hers, H. G., Europ. J. Biochem., *15*, 1 (1970).
19. Stalmans, W., De Wulf, H., Lederer, B. y Hers, H. G., Europ. J. Biochem., *15*, 9 (1970).
20. Stalmans, W., De Wulf, H. y Hers, H. G., Europ. J. Biochem., *18*, 582 (1970).
21. Schaffer, L. D., Cenoweth, M. y Dunn, A., Biochem. Biophys. Acta, *192*, 304 (1969).
22. Vilchez, C., Piras, M. M. y Piras, R., Manuscrito en preparación.
23. Kuo, J. F. y Greengard, P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., *64*, 1349 (1969).
24. Villar-Palasí, C., Ann. N. York Acad. Sci., *166*, 719 (1969).
25. Piras, M. M. y Piras, R., Arch. Biochem. Biophys., en prensa.
26. Morgan, H. E. y Parmeggiani, A., J. Biol. Chem., *239*, 2440 (1964).
27. Rothman, L. B. y Cabib, E., Biochemistry, *6*, 2098 (1967).
28. — Biochemistry, *6*, 2098 (1967).
29. Piras, R., Rothman, L. B. y Cabib, E., Biochem. Biophys. Res. Commun., *28*, 54 (1967).
30. — Biochemistry, *7*, 56 (1968).
31. Staneloni, R. y Piras, R., Biochem. Biophys. Res. Commun., *42*, 237 (1971).
32. Meyer, F., Heilmeyer, L. M. G., Haschke, R. H. y Fischer, E. H., J. Biol. Chem., *245*, 6642 (1971).
33. Piras, R. y Staneloni, R., Federation Proc., *29*, 676 (1970).

FUNCION DE LOS POLIPRENOIDES EN LA FORMACION DE UNIONES GLICOSIDICAS

Por MARCELO A. DANKERT y NICOLAS H. BEHRENS

RESUMEN

Se describen sistemas en los que mono y oligosacáridos unidos a través de fosfato o pirofosfato a alcoholes poliprenoides, actúan como intermediarios en la transferencia de azúcares de nucleótido-azúcares a polisacáridos.

En todos los casos conocidos las enzimas están asociadas a las membranas celulares de bacterias, plantas y animales.

El descubrimiento de los nucleótido-azúcares constituye uno de los acontecimientos más importantes de los últimos tiempos en el campo de la bioquímica de los hidratos de carbono. Este hallazgo ha permitido explicar fenómenos como los de interconversión de azúcares, y de síntesis de glucósidos y de oligo y polisacáridos ([1, 2, 3, 4]).

En este último caso, y tomando como ejemplo al almidón o al glucógeno, ha quedado bien claro que su síntesis tiene por lo menos dos requerimientos: un dador de restos glucosilo, es decir, un nucleótido-azúcar, y un aceptor de dichos restos, o "primer", el propio polisacárido.

El estudio de la síntesis de heteropolisacáridos de bacterias demostró que este esquema continúa siendo válido, pero aparece en escena un nuevo requerimiento, el de un factor lipídico intermediario.

1. LOS LIPOPOLISACARIDOS

Todas las bacterias se hallan limitadas por una cubierta o membrana celular de naturaleza lipoproteica, y exteriormente asociadas a ella existen varias estructuras, tales como la mureina, o pared celular, los ácidos teicoicos y los lipopolisacáridos. La función de estos últimos no se conoce, pero con toda seguridad intervienen en las relaciones entre la bacteria y su medio. Son responsables de la actividad endotóxica de las enterobacterias y de muchas de sus propiedades antigénicas. Además poseen estructuras, o receptores, sobre las cuales se fijan ciertos bacteriófagos. Su composición química ha sido estudiada especialmente en enterobacterias y, en varias especies de *Salmonella,* se la conoce con cierto detalle. Es una macromolécula compleja formada por 3 partes principales: el lípido A, la región central y el antígeno O o antígeno somático (fig 1) ([5, 6, 7, 8]).

La región central es muy compleja. Contiene glucosa, galactosa, N-acetil glucosamina y varios componentes poco comunes: una heptosa, ácido cetodeoxioctanoico, fosfato de etanolamina. Esta región está unida al lípido A a través del ácido cetodeoxioctanoico y es común a casi todas las enterobacterias. Contrariamente la estructura del antígeno O varía mucho y es característica de cada especie.

2. BIOSINTESIS DE LOS LIPOPOLISACARIDOS

A la luz de los conocimientos actuales el lípido A y la región central se sintetizan en la célula independientemente del antígeno O; y este último se une a la región central en la etapa final de su biosíntesis ([7, 8, 9, 10]).

Los descubrimientos de Nikaido ([8]) trabajando con mutantes de *Escherichia* y *Salmonella* y los estudios de Osborn, Horecker y colaboradores ([7]) demuestran que en *S. typhimurium* parte de la región central se sintetiza a partir de UDP-glucosa, UDP-galactosa y UDP-Nacetil glucosamina que sucesivamente transfieren su respectivos monosacáridos a los adecuados aceptores. En cada etapa se agrega un nuevo azúcar al extremo no reductor del aceptor y el producto se convierte en el aceptor de la etapa siguiente (fig. 2). Es decir, se repite el esquema ya conocido para el glucógeno, pero con

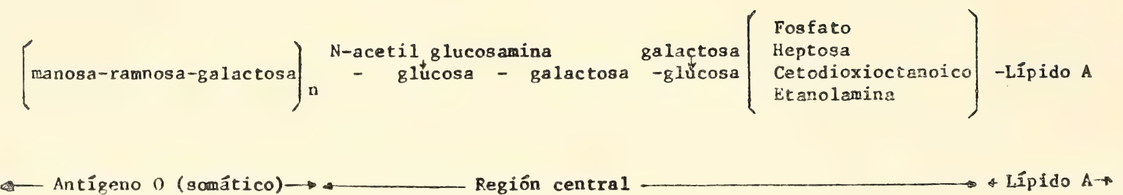


Fig. 1. — Esquema de la estructura del lipopolisacárido de *Salmonella*

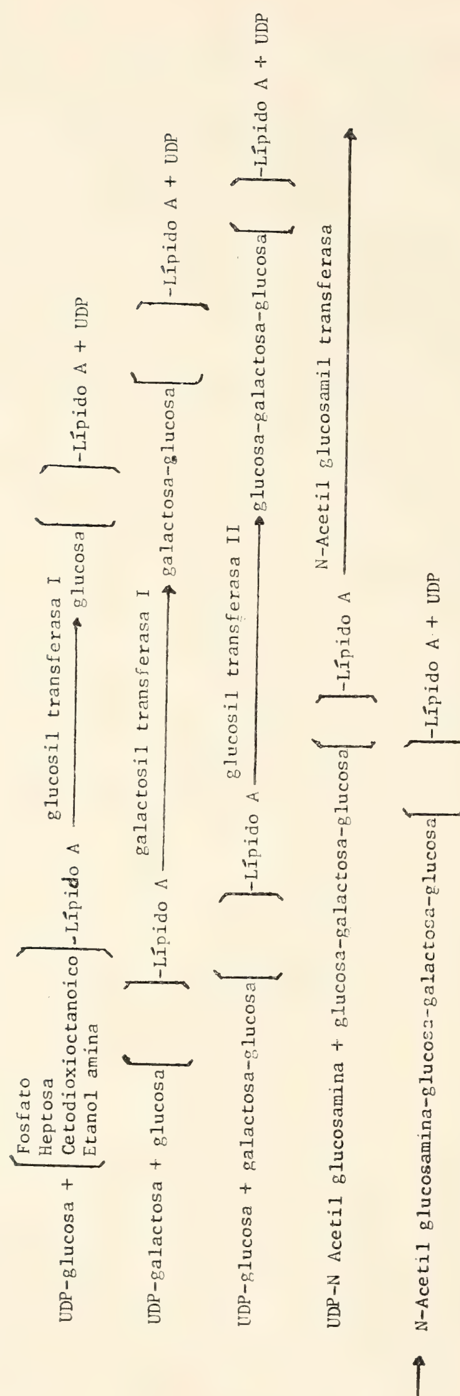


Fig. 2. — Esquema de la biosíntesis de parte de la región central

la complicación de que son varios los nucleótido-azúcares dadores y las enzimas transferentes.

La biosíntesis del antígeno O, en cambio, sigue un esquema completamente diferente: los azúcares no son transferidos directamente al producto final sino a un compuesto intermediario, que a su vez se encarga de la polimerización y transferencia a la región central para constituir el lipopolisacárido completo.

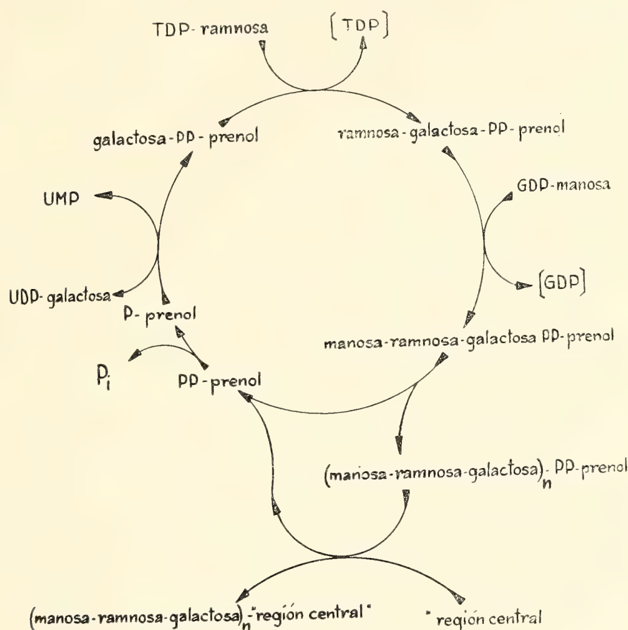


Fig. 3. — Esquema de la biosíntesis del polisacárido 0

Este sistema fue estudiado con detalle por Robbins y colaboradores [9, 10, 11]. en varios especies de *Salmonella.* Uno de los hallazgos más importantes fue el aclarar que los 3 ó 4 azúcares que constituyen el polisacárido O están agrupados regularmente formando unidades repetitivas (fig. 1). En el caso de *S. newington* demostraron que la unidad repetitiva está constituida por manosil-ramnosil-galactosa [11] y que se sintetiza a partir de los nucleótido-azúcares GDP-manosa, TDP-ramnosa y UDP-galactosa respectivamente [12].

El estudio detallado del mecanismo de biosíntesis del polisacárido O condujo a proponer el esquema representado en la figura 3 [9]. En este esquema a los requerimientos clásicos de nucleótido-azúcar

dador, y de polisacáridos aceptor se agrega un nuevo factor, de naturaleza lipídica: un fosfato de prenol *.

En el primer paso del mecanismo propuesto el UDP-galactosa transfiere galactosa 1-fosfato al fosfato de prenol para formar prenol-difosato galactosa. En el segundo paso el TDP-ramnosa cede ramnosa al resto galactosilo del prenol difosfato galactosa para formar prenol-difosfato-ramnosil galactosa. La unidad repetitiva se completa cuando el GDP-manosa cede un resto manosa para formar prenol-difosfato manosil-ramnosil galactosa. El antígeno O se forma mediante la polimerización de estas unidades repetitivas y finalmente se transfiere a la región central para formar el lipopolisacárido.

Varios aspectos de este esquema merecen destacarse:

1º) La participación del fosfato de prenol introduce un compuesto intermediario en la construcción del heteropolisacárido. Los dadores de azúcares continúan siendo los nucleótido-azúcares, pero ceden su resto monosacárido al prenol derivado y no al producto final. De esta manera los prenol-difosfato azúcares son los inmediatos precursores del polisacárido final.

2º) En el primer paso, el UDP-galactosa transfiere galactosa 1-fosfato a un fosfato aceptor restaurando la unión pirofosfato preexistente en el nucleótido dador. Desde un punto de vista energético ésta es una manera de mantener a los intermediarios poliprenoides en el estado "activado" necesario para su polimerización final.

3º) El prenol pirofosfato liberado después de la transferencia de trisacárido debe perder un fosfato a fin de volver a entrar en el ciclo. Esta reacción hidrolítica podría actuar como fuerza adicional en el sentido de la síntesis.

4º) El prenol fosfato es un único ejemplo de lípido funcional. Los fosfolípidos más abundantes de la célula: fosfatidil glicerol, fosfatidil serina, fosfatidil etanolamina y cardiolipina son todos derivados de ésteres grasos del glicerol, fosfato y distintos substituyentes; y son componentes estructurales de la membrana celular. El caso de los prenol-difosfato azúcares es totalmente distinto pues se trata de un nuevo grupo de substancias, de glicofosfolípidos por así llamarlos, con una función metabólica perfectamente establecida.

* Estrictamente, fosfato de poliisopreno-1-ol, pero como no hay acuerdo con respecto a la denominación de estos compuestos, en adelante los llamaremos prenoles.

Por otra parte la naturaleza lipídica de los prenol difosfato azúcares permite considerar a estos compuestos como análogos de los nucleótido difosfato azúcares, pero adecuados al medio lipofílico de la membrana, que es donde con mucha verosimilitud tiene lugar todo el proceso biosintético.

5º) Por último, en la etapa de polimerización, la dirección de crecimiento de la cadena es hacia el extremo reductor. Contrariamente a lo que sucede en los casos clásicos del glucógeno, del almidón y aún de la región central del lipopolisacárido, las nuevas uni-

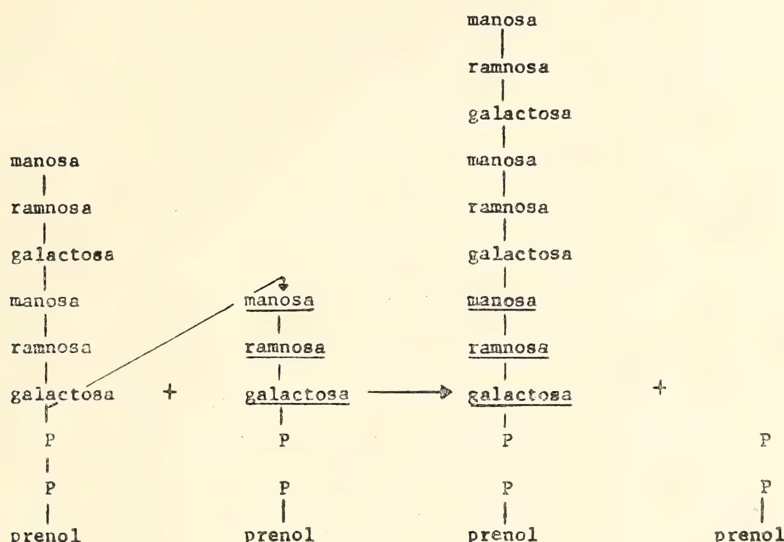


Fig. 4. — Modelo del mecanico de alargamiento de las cadenas de polisacárido 0

dades repetitivas no se adicionan al extremo no reductor de la cadena, es decir la manosa, sino que la cadena creciente que ya posee varias unidades repetitivas, se transfiere a un nuevo trisacárido (Fig. 4) [13]. Como consecuencia la nueva unidad repetitiva aparece como adicionada al extremo reductor de la cadena preexistente.

Varios grupos de investigadores han llegado a esquemas similares. Osborn y colaboradores emplearon *S. typhimurium* ([7]) y Strominger y su grupo describieron un ciclo parecido para la síntesis de mureína, el complejísimo heteropolisacárido que constituye la pared celular de bacterias ([14]).

Recientemente Heath y colaboradores encontraron que la biosíntesis de un heteropolisárido capsular, en *Aerobacter aerogenes*, si-

gue un esquema análogo (15) y otro tanto sucede con un glucano extracelular, en *Acetobacter xylinum,* aunque en este caso se trata de un homopolisacárido (16).

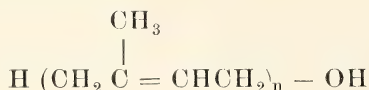
En la síntesis de ácidos teicoicos también se han descripto lípidos intermediarios (17), lo que permite concluir que todas las estructuras asociadas a la membrana celular parecen seguir esquemas biosintéticos parecidos.

El ciclo presentado en la figura 2 puede ser aún más complejo. En *S. minneapolis* la unidad repetitiva consta de 4 azúcares: el trisacárido manosil-ramnosil-galactosa posee un resto glucosilo unido al carbono 4 de la galactosa (11). El dador es UDP-glucosa, pero en este caso no actúa directamente sino a través de un prenol (18). No se sabe exactamente en qué etapa del ciclo se adiciona esta glucosa, si antes o después de la polimerización. Curiosamente, en ese caso la unión entre el lípido y el azúcar está dado por un solo fosfato y no por un puente pirofosfato como en los casos arriba mencionados. Estos prenol-monofosfato azúcares parecen actuar de manera algo distinta: el azúcar cedido no forma parte de la cadena central del polisacárido sino que ocupa ramas laterales. Serían pues "modificadores" de una cadena preexistente. Este mecanismo ha sido descripto también en la síntesis de manano en *Micrococcus lysodeikticus* (19). Se aisló un prenol-fosfato-manosa capaz de transferir manosa para formar ramas laterales de manano, pero no para constituir la cadena central.

3. PRENOLES

Las estructuras encontradas para la porción lipofílica de los intermediarios en bacterias, indicaron que los prenoles tenían una función inesperada en la célula. Veamos con cierto detenimiento algunas propiedades de estos compuestos.

Los prenoles se han encontrado en seres vivos desde las bacterias hasta los mamíferos. Su fórmula es la siguiente:



$$H(CH_2\overset{\overset{\large CH_3}{|}}{C}=CHCH_2)_n-OH$$

El número *n* de unidades isopreno varía entre 7 y 24. También varían las dobles ligaduras que pueden ser cis o trans o estar en

parte saturadas. Estas diferencias dan lugar a muchos isómeros y homólogos.

El primer prenol que se aisló fue el solanesol ([20]), que se encontró en hojas de tabaco. Tiene 9 unidades isopreno, todas trans. Luego se han estudiado muchos otros como puede verse en la tabla I. Han recibido nombres relacionados con la fuente de don-

TABLA I

Prenoles de diferentes fuentes naturales

Nombre	Fuente natural	*n*	uniones trans	isoprenos saturados
Solanesol....	tabaco	9	8	0
Castaprenol..	castaño	9-13	3	0
Ficaprenol...	gomero	10-12	3	0
Betulaprenol.	abedul	6-9	2	0
Heveaprenol.	hevea	10-13	3	0
Dolicol......	levadura	14-18	-	1
—	anemona de mar	18-21		
—	*Aspergillus fumigatus*	18-24	2	3 (α, ω, φ)
Undecaprenol	*M. lysodeikticus*	11	2	0
Bactoprenol..	*L. acidophilus*	11	-	1 (interna)
Dolicol	tejidos animales	16-23	2	1 (α)

Nota. — Se ha determinado que el bactoprenol no posee un isopreno saturado sino que el compuesto sería idéntico al undecaprenol (comunicación personal Baddiley, J.).

de se los extrajo. El dolicol fue designado así por tener la cadena muy larga (dolikos = largo, en griego). El de cadena más corta (n = 7-9) es el betulaprenol de la madera. Luego le siguen los de hojas y bacterias (n = 10-13) y los más largos son los de levadura, *Aspergillus* y de animales. Es de notar que el largo de cadena es variable dentro de ciertos límites para todas las preparaciones. Esto se ha comprobado por cromatografía gaseosa o por cromatografía en capa delgada con fase invertida. Es interesante señalar que la coenzima Q o ubiquinona tiene una cadena lateral poliprenoide y que se encuentran homólogos con n = 6-10 ([21]).

El grado de saturación sólo cambia en algunos casos. En el dolicol la unidad de isopreno-α, es decir la que lleva el grupo alcohólico está saturada. El prenol de levadura es probablemente igual.

En cuanto a los grupos cis y trans, éstos han sido determinados por resonancia magnética nuclear (NMR) [22]. Este método da relación de cantidad entre uno y otro, pero no permite saber en qué puntos de la cadena están colocados. Casi todos los isoprenos son cis salvo 3 internos en los prenoles de hojas y 2 en los demás.

Biosíntesis de la cadena isoprenoide

Resultados preliminares de la biosíntesis del intermediario en *Salmonella,* indican que el mecanismo catalizado por enzimas de membrana podría ser el indicado en la figura 5 [23]. El farnesil

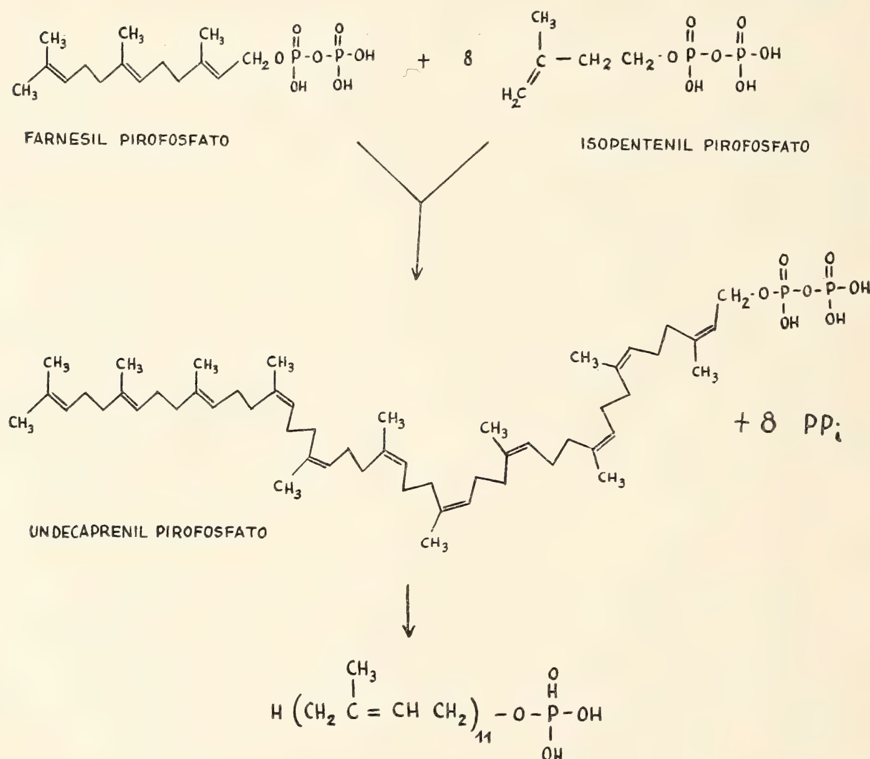


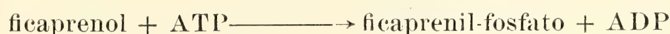
Fig. 5. — Biosíntesis de prenol fosfato

pirofosfato tendría las 2 dobles ligaduras trans que en el producto final quedarían en el extremo opuesto al grupo alcohólico y el isopentil pirofosfato se condensaría de manera que las restantes dobles ligaduras fueran cis.

El producto de polimerización es un pirofosfato que se hidroliza posiblemente con la misma fosfatasa que actúa sobre el P-P-prenol en el ciclo biosintético del antígeno O de *Salmonella* (fig. 3).

Una quinasa de prenoles

Una quinasa encontrada por Higashi, Siewert y Strominger ([24]) en *S. aureus* cataliza la reacción de fosforilación de diversos prenoles:


ficaprenol + ATP ⟶ ficaprenil-fosfato + ADP

Además de los ficaprenoles, sirven como substratos los betulaprenoles. El componente más abundante de los ficaprenoles es de $n = 11$ con 3 dobles ligaduras trans, en cambio el prenol aislado de *S. aureus* ([25]) es de $n = 11$ con sólo 2 dobles ligaduras trans. El solanesol es muy mal substrato para esta quinasa.

Es interesante destacar que esta quinasa de prenoles es soluble en diversos solventes orgánicos e insoluble en agua. Es más, mientras que suspendida en agua es muy inestable, en solución butanólica es relativamente estable.

La función de esta quinasa no se conoce pero podría servir como segundo mecanismo de síntesis de prenoles fosfato, actuando sobre los prenoles libres de la célula.

El prenol que actúa como intermediario en la formación de manano en *M. lysodeikticus* es igual al de *S. aureus* recién mencionado. Con una enzima de *M. lysodeikticus* el ficaprenol fosforilado químicamente da actividad como aceptor de manosa del GDP-manosa igual al compuesto extraído de la propia bacteria ([26]).

Estos resultados indican que las enzimas que actúan de alguna forma sobre los prenoles poseen cierta especificidad, ya que distinguen entre solanesol y ficaprenol, pero no distinguen cuando la diferencia es de una sola unión trans.

4. PRENOLES INTERMEDIARIOS EN PLANTAS Y ANIMALES

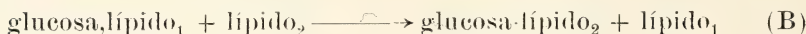
Una vez esclarecido el mecanismo por el cual intermediarios poliprenoides intervienen en el mecanismo de biosíntesis de polisacáridos de pared celular de bacterias, varios laboratorios se interesaron en encontrar mecanismos similares en plantas y animales. El hecho que se encontraran prenoles en todos los tejidos (tabla I), hacía probable esta hipótesis.

En tejidos vegetales, Villemez y Clark ([27]) y Kauss ([28]) encontraron evidencias que glicolípidos similares a los de bacterias serían intermediarios en la biosíntesis de polisacáridos de pared celular. Caccam y colab. ([29]) obtuvieron evidencias cinéticas que indicaban la intervención de un manolípido en la formación de una manoproteína.

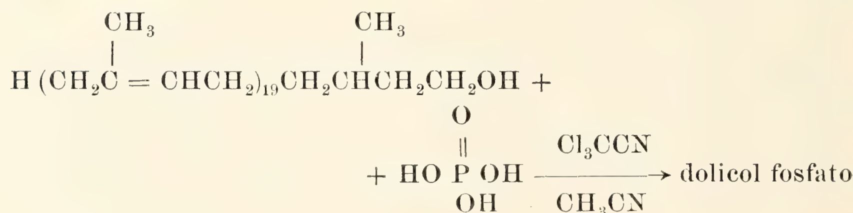
Se buscaron mecanismos similares en varios tejidos animales, en especial en hígado. Se encontró que una enzima microsomal hepática catalizaba la siguiente reacción ([30]):



El glucolípido reaccionaba a su vez según la reacción:



Para determinar la estructura del lípido₁, se buscaron condiciones experimentales en las cuales la reacción (A) se estimulara por agregado de ese lípido. Una vez encontradas esas condiciones, se preparó dolicol de hígado, se lo purificó según la técnica de Burgos *et al.* ([31]) y se lo fosforiló según Popjack *et al.* ([32]):

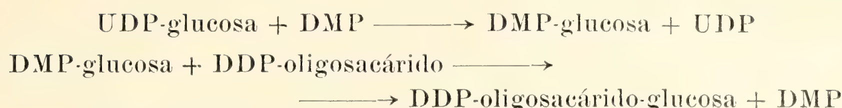


El producto de la fosforilación química, dolicol monofosfato (DMP), estimuló la reacción (A) igual que los extractos naturales de lípido₁ estableciéndose así que el lípido₁ podía ser DMP. La identidad de ambos compuestos se confirmó comparándolos en varios sistemas de cromatografía de capa fina y por sus espectros en el infrarrojo.

Como el glucosa-lípido₁ se descompone por tratamiento ácido solamente en glucosa y DMP, este compuesto sería dolicol monofosfato glucosa (DMP-glucosa).

La estructura del lípido₂ no está aún determinada con seguridad pero existen algunas evidencias que indican que podría ser dolicol difosfato oligosacárido (DDP-oligosacárido).

Si estos resultados preliminares se confirmaran, las reacciones (A) y (B) podrían escribirse tentativamente de la siguiente forma:


UDP-glucosa + DMP ⟶ DMP-glucosa + UDP

DMP-glucosa + DDP-oligosacárido ⟶

⟶ DDP-oligosacárido-glucosa + DMP

Resulta evidente el parecido de este esquema con el encontrado en bacterias. ¿Podría ser éste el camino biosintético de los antígenos de células de mamíferos? Un estudio en esta dirección se está llevando a cabo en la actualidad.

5. ALGUNAS PROPIEDADES QUIMICAS DE LOS PRENOLES

Los trabajos realizados con estos intermediarios han sido más bien bioquímicos y de determinación de estructuras y no se han estudiado con detenimiento las propiedades de las uniones involucradas. Creemos a pesar de esto que puede ser interesante reunir datos de los diferentes laboratorios y comparar las propiedades de estas uniones con las mismas en compuestos mejor estudiados.

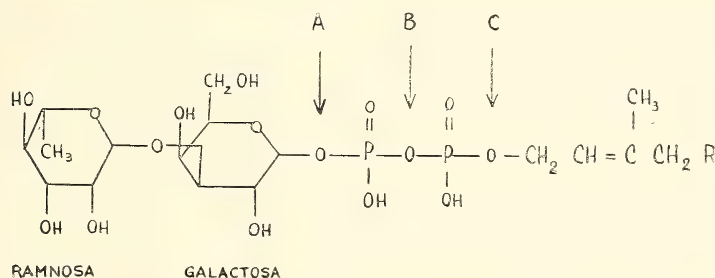


Fig. 6. — Uniones lábiles al ácido en el ramosil-galactosil pirofosfato prenol

Tratamiento ácido

Estos intermediarios son diésteres de fosfato o pirofosfato, según el caso, de manera que varias uniones son muy susceptibles al tratamiento ácido.

El intermediario de *Salmonella*, ramnosil-galactosil pirofosfato prenol tratado con HCl 0,01 N, 5 minutos a 100°, se rompe completamente en A y C dando pirofosfato ([33]) (fig. 6). La unión B del pirofosfato es evidentemente más estable.

Este resultado está de acuerdo con datos de hidrólisis ácida de galactosa 1-fosfato, que tiene una vida media unas cinco veces me-

nor que el pirofosfato inorgánico [34]. Sin embargo en *A. xylinum* se ha encontrado que un glucosil pirofosfato prenol también libera pirofosfato por tratamiento ácido, aun cuando la vida media de la glucosa-1-fosfato es aproximadamente igual a la del pirofosfato [35].

El tratamiento del manosil fosfato undecaprenol con HCl 0,01 N, por 1 minuto a 100°, en un medio metanol-agua, produce una descomposición total del compuesto en manosa (70 %) y manosa-1-fosfato (30 %) [36]. La unión A es pues más inestable que la de B (fig. 7).

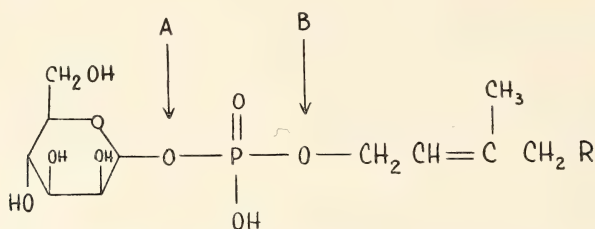


Fig. 7. — Uniones lábiales al ácido en el manosil fosfato prenol

Si comparamos la velocidad de hidrólisis de la unión azúcar fosfato en los prenol fosfo azúcares con la de otros compuestos similares, se llega a conclusiones interesantes. En la tabla II se han

TABLA II

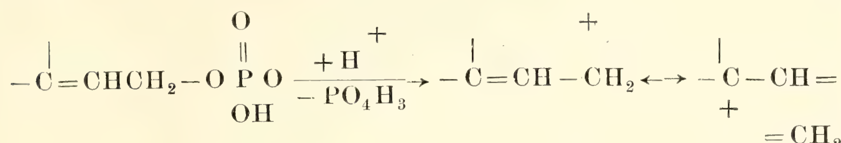
Comparación de la vida media (t 1/2) de hidrólisis de diferentes glucósidos

	Condiciones	t 1/2 minutos
Unión glicosídica (maltosa)	1N H^+ 100°	30′ (aprox.)
Glucosa-1-fosfato.........	1N H^+ 33°	30′
DMP-glucosa............	0,1N H^+ (en metanol) 37°	7′

anotado 3 ejemplos de velocidad de hidrólisis ácida de glucósidos. Es notable como aún con condiciones cada vez más suaves, la vida media de hidrólisis disminuye. Se observa que la maltosa tiene aproximadamente la misma vida media que el glucosa-1-fosfato pero este último es tratado a sólo 33°. A su vez el glucosa-1-fosfato es mucho más estable que el DMP-glucosa. Este prenol-fosfo-azúcar, con ácido diez veces más diluido, se hidroliza 4-5 veces más rápido que el glucosa-1-fosfato.

En la hidrólisis ácida de un éster fosfórico (el fosfato unido al carbono 1 del azúcar) se supone que existe una interacción entre el fosfato y el azúcar que facilita la formación del ión carbonio (fig. 8), reacción que es posiblemente limitante en el mecanismo de hidrólisis. Esta interacción es evidentemente aún más fuerte en el caso de los prenol fosfo-azúcares, ya que parecen ser unas 30 veces más lábiles que los ésteres fosfóricos sencillos.

En cuanto a la inestabilidad de la unión fosfato-prenol, ésta se debería en parte a la formación del carbonio alílico:



ya que cuando el isopreno es saturado como en los derivados del dolicol, la unión es relativamente estable a tratamientos en ácido concentrado a 100° (en estas condiciones el prenol se destruye).

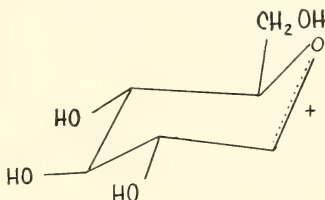


Fig. 8. — Ion carbonio, intermediario en la hidrólisis ácida de glucósidos

Además del derivado de glucosa del dolicol, el DMP-glucosa, se encontraron en hígado enzimas que forman otros dolicol monofosfato azúcares: dolicol monofosfato N-acetil glucosamina (DMP-acetil glucosamina) y dolicol monofosfato manosa (DMP-manosa) ([37]).

Es interesante estudiar el efecto de un cambio de estructura en el monosacárido sobre la cinética de hidrólisis ácida. En la tabla III se muestran los datos de velocidad de hidrólisis para varios derivados de los 3 azúcares. (Estos valores tomados de la literatura, fueron normalizados aproximadamente a condiciones iguales con el fin de poder compararlos). El hecho de que el derivado de N-acetil glucosamina (el DMP-acetil glucosamina) sea más estable que el DMP-glucosa es consistente con los datos de los ésteres fosfóricos. Sin embargo en el caso de la manosa, no se explica porque es casi 2 veces más lábil que el glucosil derivado.

Un dato adicional que señala cuánto influye el resto dolicol en la velocidad, es que el DMP-glucosa se hace más estable al ácido cuando el medio de hidrólisis contiene más de 5 % de agua.

TABLA III

Velocidades de hidrólisis ácida de derivados de glucosa, N-acetil glucosamina y manosa. Se tomó la velocidad del metil glucósido como 1 y se refirieron apróximadamente los datos de la literatura a ese valor.

Tabla	β —OCH_3	β —OPO_3H_2	α —OPO_3H_2	α -pirofosfato-nucleósido	—OPO(=O)(O)—dolicol
GLUCOSIL (CH_2OH, OH, HO, OH)	1	80	30	75	250
N-ACETIL GLUCOSAMIL (CH_2OH, OH, HO, $NHCOCH_3$)	10	—	20	35	80
MANOSIL (CH_2OH, HO, HO, HO)	2,5	—	20	—	450

Tratamiento alcalino

Con amoníaco 30 % a temperatura ambiente, se pudo demostrar la descomposición del prenol pirofosfato azúcar en el éster cíclico ramnosil-galactosil 1-2-fosfato cíclico (fig. 9) ([38]). Una descomposición similar se había demostrado para el UDP-glucosa ([39]).

Los monofosfatos derivados no se atacan con amoníaco a temperatura ambiente posiblemente porque la unión del fosfato al isopreno es estable en esas condiciones. Sin embargo en condiciones algo más fuertes, hidróxido de sodio 0,1 N a 64° en n-propanol, los dolicol monofosfato azúcares se descomponen. En el caso de DMP-glucosa se estudió la reacción con cierto detalle y se pudo demos-

trar la formación del 1-6 anhidroglucosano, que se produciría por el mecanismo de la figura 10 ([40]). Esta descomposición permitió proponer la configuración β para la unión glucosa fosfato en el DMP-

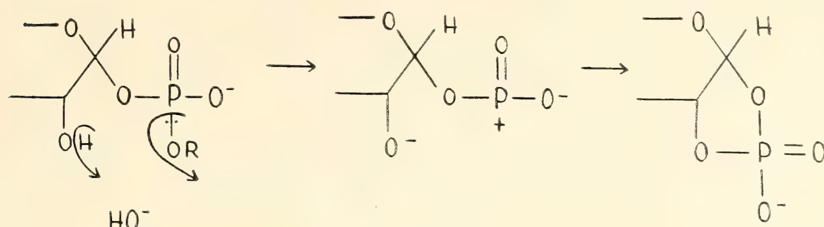


Fig. 9. — Descomposición con amoníaco de prenol pirofosfato azúcares

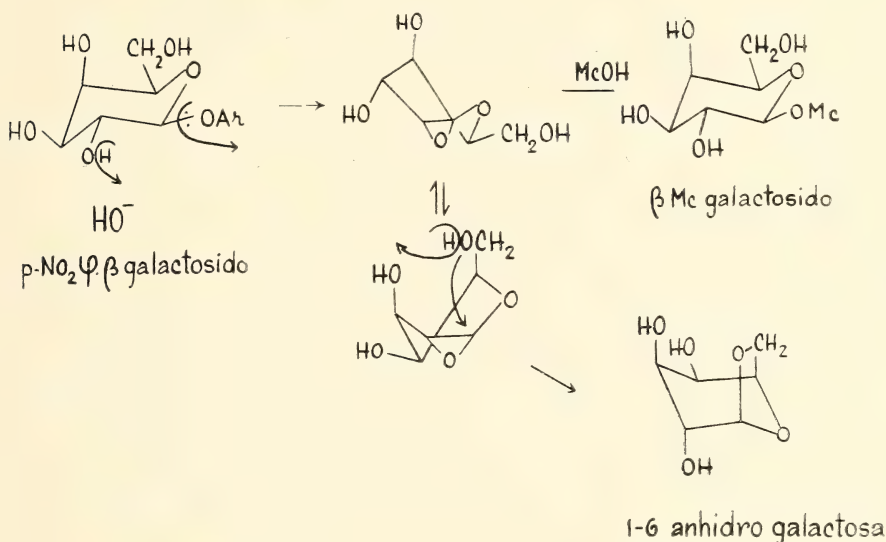


Fig. 10. — Mecanismo de la descomposición alcalina del p.$NO_2\varphi\beta$ galactósido

glucosa, ya que estudios de descomposición alcalina de aril glicósidos indican que con pocas excepciones los glicósidos β son los que dan 1-6 anhidro derivados (o sea, aquellos donde el sustituyente en el C_1 es cis al C_6) ([40]).

Los estudios de descomposición alcalina de los DMP derivados de N-acetil glucosamina y de manosa están incompletos, pero ya se observa una interesante contradicción con lo que podría haberse predicho. En la tabla IV, tomada del trabajo de Capon ([40]), se observa que la introducción de un sustituyente en el C_2 drástica-

mente inhibe la hidrólisis alcalina. Esta influencia de un sustituyente en el C_2 no se observa en los DMP-azúcares. Tratando DMP-glucosa y DMP-acetil glucosamina con HONa 0,1 N, 10 minutos a 100°, éstos se descomponen un 100 % y 74 % respectivamente. Evidentemente sustituir un hidroxilo por un acetamido tiene muy poco efecto sobre la cinética.

TABLA IV

Velocidad de descomposición alcalina de glicósidos del p-NO_2 fenol

p-NO_2 fenil glicósido	Velocidad
β-galactósido	416
2-metil β-galactósido	1,3
α-manósido	3090
2-metil α-manósido	1,6

CONCLUSIONES

En resumen, el estudio de la biosíntesis de diversos polisacáridos de distinto origen, ha puesto de manifiesto que, en varios casos, a los requerimientos "clásicos" de nucleótido-azúcar dador y polisacárido o "primer aceptor" debe incorporarse otro factor más de carácter lipídico. Este factor es el inmediato precursor del polisacárido y consiste en un prenol difosfato azúcar, si se trata de construir la cadena principal o en un prenol monofosfato azúcar, si se trata de formar cadenas laterales.

La naturaleza lipídica de estos compuestos parece muy adecuada para desempeñarse en medios hidrofóbicos tales como la membrana citoplasmática o el retículo endoplasmático. Por otra parte el estudio de las propiedades de estas sustancias revela que son muy sensibles a tratamientos químicos suaves. Posiblemente tanto la unión del pirofosfato al azúcar como la del fosfato al azúcar son del tipo de las de "alta energía", consecuentemente con su carácter de componentes intermediarios. No obstante el estudio de los "glicofosfolípidos" es muy reciente y con toda seguridad en los próximos años se descubrirán nuevos procesos que modificarán las ideas actualmente vigentes.

BIBLIOGRAFIA

1. Cardini, C. E., *Polisacáridos Vegetales,* Ciencia e Investigación, *22,* 531 (1966).
2. Leloir, L. F., *The Biosynthesis of Polysaccharides,* Proc. Plen. Sess. 6th International Congress of Biochem.. New York, 1964.
3. — *Nucleoside Diphosphate Sugars and Saccharide Synthesis,* Biochem. J., *94,* 1 (1964).
4. Ginsburg, V., *Sugar Nucleotides and the Synthesis of Carbohydrates,* Adv. Enzymol., *26,* 35 (1964).
5. Luderitz, O., *Recent Results on the Biochemistry of the Cell Wall Lipopolysaccharides of Salmonella. Bacteria,* Angewandte Chemie, *9,* 649 (1971).
6. Luderitz, O., Jann, R. y Wheat, R., in Comprehensive Biochemistry, *26 A,* 105-228. Florkin, M., Stotz, E. M., Eds. American Elsevier Publishing Co. New York, 1968.
7. Osborn, M. J., *Structure and Biosynthesis of the Bacterial Cell Wall,* Ann. Rev. Biochem., *38,* 501 (1969).
8. Nikaido, B., Adv. Enzymol., *31,* 77 (1968).
9. Robbins, P. W., Wright, A. y Dankert, M., J. Gen. Physiol., *49,* 331 (1966).
10. Robbins, P. W., Bray, O., Dankert, M. y Wright, A., Science, *158,* 1536 ((1967).
11. Robbins, P. W. y Uchida, J., Biochemistry, *1,* 323 (1962); J. Biol. Chem., *240,* 375 (1965).
12. Robbins, P. W., Wright, A. y Bellows, J., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., *52,* 1302 (1964).
13. Bray, D. y Robbins, P. W., Biochem. Biophys. Res. Comm., *28,* 334 (1967).
14. Ghuyen, J. M., Strominger, J. L. y Tipper, D. J., in Comprehensive Biochemistry, *26 A,* 53-104 (Ver. ref. 6).
15. Troy, F. A., Frerman, F. E. y Heath, E. C., J. Biol. Chem., *246,* 118 (1971).
16. Recondo, E., García, R. y Dankert, M., en preparación.
17. Brooks, D. y Baddiley, J., Biochem. J., *115,* 307 (1969).
18. Wright, A., J. Bacteriol., *105,* 927 (1971).
19. Scher, M. y Lennarz, W. J., J. Biol. Chem., *244,* 2777 (1969).
20. Rowland, R. L., Latimer, P. H. y Giles, J. A., J. Am. Chem. Soc., *78,* 4680 (1956).
21. Hatefi, Y., Adv. Enzymology, *25,* 275 (1963).
22. Feeney, J. y Hemming, F. W., Anal. Biochem., *20,* 1 (1967).
23. Cristenson, J. G., Gross, S. K. y Robbins, P. W., J. Biol. Chem., *244,* 5436 (1969).
24. Higashi, Y., Siewert, G. y Strominger, J. L., ibíd., *245,* 3683 (1970).
25. Higashi, Y. y Strominger, J. L., ibíd., *245,* 3691 (1970).
26. Lalaw, M., Chiu, T. H. y Lennarz, W. J., ibíd., *244,* 5890 (1899).
27. Villemez, C. L. y Clark, A. F., Biochem. Biophys. Res. Comm., *36,* 57 (1969).
28. Kauss, H., FEBS Letters, *5,* 81 (1969).
29. Caccam, J. F., Jackson, J. J. y Eylar, E. H., Biochem. Biophys. Res. Comm., *35,* 505 (1969).

30. Behrens, N. H. y Leloir, L. F., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., *66,* 153 (1970).
31. Burgos, J., Hemming, F. W., Pennock, J. F. y Morton, R. A., Biochem. J., *88,* 470 (1963).
32. Popják, G., Cornforth, J. W., Cornforth, R. H., Ryhage, R. y Goodman, D. W. S., J. Biol. Chem., *237,* 56 (1962).
33. Wright, A., Dankert, M., Fennessey, P. y Robbins, P. W., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., *57,* 1798 (1967).
34. Leloir, L. F. y Cardini, C. E., en Methods in Enzymology (Editors : S. P. Colowick y N. O. Kaplan), Vol. III, pag. 840, Acad. Press, N. York, 1957.
35. Dankert, M. A., resultados no publicados.
36. Scher, M., Lennarz, W. J. y Sweeley, C. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., *59,* 1313 (1968).
37. Behrens, N. H., Parodi, A. J., Leloir, L. F. y Krisman, C. R., Archives Biochem. Biophys., *143,* 375 (1971).
38. Dankert, M. A., Wright, A., Kelley, W. S., y Robbins, P. W., ibíd.. *116,* 425 (1966.).
39. Paladini, A. C. y Leloir, L. F., Biochem. J., *51,* 426 (1952).
40. Capon, B., Chem. Rev., *69* (1968).

LOS GANGLIOSIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Por RANWEL CAPUTTO y ALICIA H. R. MACCIONI

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina

RESUMEN

Los gangliósidos son esfingoglicolípidos estructurales que hasta el presente se han encontrado solamente en tejidos animales; la materia gris del cerebro los contiene en mayor cantidad, especialmente a aquéllos de estructura más compleja, lo que sugiere que podrían desempeñar un rol específico en el sistema nervioso central.

Experimentos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* con tejido cerebral, parecen indicar que cada organela celular es capaz de sintetizar independientemente sus propios gangliósidos; hay además evidencias de que los intermediarios comunes en la formación de los gangliósidos de diferente grado de complejidad no forman « pool » común sino que se encuentran en diferentes compartimientos.

Los experimentos diseñados para conocer si la estimulación sensorial provoca cambios en el metabolismo de los gangliósidos de cerebro revelaron diferencias significativas en la incorporación de precursores radiactivos en gangliósidos provenientes de animales sometidos a estimulación sensorial y animales controles.

Los gangliósidos son glicolípidos, es decir, compuestos constituidos por una fracción lipídica y una glicosídica. La fracción lipídica es llamada ceramida y resulta de la unión de un ácido graso que generalmente es el esteárico y una esfingosina que generalmente es la dehidroesfingosina o la esfingosina de 20C. La cadena glicosídica está constituida por una secuencia lineal de carbohidratos que incluye glucosa, galactosa, N-acetil-galactosamina y galactosa, a la cual se le agrega, generalmente como una ramificación, un ácido siálico; éste es un componente característico en la composición de los gangliósidos y éstos se suelen designar comúnmente teniendo en cuenta el número de grupos sialilos que contienen en

sus moléculas. Así por ejemplo, los grupos principales de gangliósidos que se encuentran en el cerebro se denominan monosialo, disialo y trisialo gangliósidos (Kuhn y Wiegandt, 1963 *a, b*). La figura 1 muestra la fórmula de un monosialogangliósido.

Nótese que en este compuesto, el ácido siálico está unido a la galactosa proximal a la ceramida, formando una ramificación de la cadena glicosídica mayor. El ácido sialico está siempre unido a esta galactosa cuando el gangliósido contiene un solo grupo sialilo; cuando hay dos o tres, pueden estar unidos a la galactosa distal del grupo ceramida terminando la cadena o al grupo sialilo unido a la galactosa proximal.

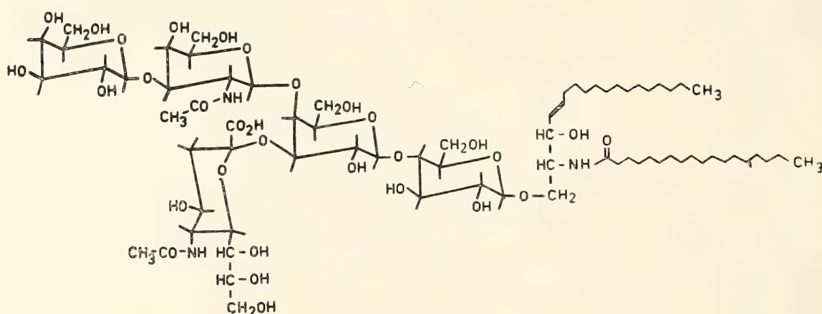


Fig. 1. — Estructura de un monosialogangliósido (Kuhn y Wiegandt, 1963, a)

En el cerebro se encuentran también cantidades relativamente menores de gangliósidos más simples, como los llamados gangliósidos Tay Sachs (que, según los casos, pueden contener uno o dos grupos sialilos en cadena) los cuales carecen de la galactosa terminal y los hematósidos (que también pueden contener uno o dos grupos sialilos en cadena) los cuales carecen de N-acetil galactosamina y galactosa terminal.

Si bien los gangliósidos de cadena glicosídica completa son los que prevalecen en el sistema nervioso central, los gangliósidos de cadenas glicosídicas cortas o incompletas, tales como los hematósidos, prevalecen en el músculo (Lassaga, Albarracín de Lassaga y Caputto, 1967), y vísceras (Ledeen, Salsman y Cabrera, 1968).

La particularidad de reunir en una misma molécula una fracción de propiedades lipídicas y otra fracción de características hidrofílicas y el hecho de contener 1 ó más residuos de ácido siálico ha atraído la atención de los investigadores. El siálico es un ácido relativamente fuerte (pK = 2,6) y por lo tanto está totalmente

disociado a pH 7, es decir a un pH que es normal para la célula. Su función específica en los gangliósidos no se conoce pero el interés que suscita su presencia en estos compuestos se justifica si se recuerda que los gangliósidos son elementos estructurales de la membrana neuronal, una de cuyas funciones más importantes parece ser la regulación del pasaje de iones.

Han sido comunicados experimentos en los cuales se restableció la excitabilidad nerviosa a la corriente eléctrica en cortes de tejido nervioso por la adición de gangliósidos (Balakrishnan y Mc Ilwain, 1961) y otros en los cuales la adición de estos compuestos restableció la respuesta de la pared gástrica a la serotonina (Wooley y Gommi, 1964, 1965). Por otra parte, Van Heyningen (1959), Mellanby y Whittaker (1968) Simpson y Rapport (1971), encontraron que las toxinas tetánica y botulínica, que tienen marcada acción sobre el sistema nervioso central, se fijan preferentemente a ciertas fracciones de gangliósidos.

Sería prematuro concluir que los experimentos referidos anteriormente indican las funciones que tienen los gangliósidos ubicados en su sitio específico en la membrana, pero de cualquier manera, si tales efectos se confirman, éstos serían de gran interés biológico y el estudio de los mecanismos por los cuales tales efectos se producen puede dar resultados importantes en relación con los requerimientos necesarios para que se manifieste el fenómeno de excitabilidad nerviosa.

DISTRIBUCION DE GANGLIOSIDOS EN DIFERENTES TEJIDOS ANIMALES

La materia gris del cerebro, con una concentración de gangliósidos de aproximadamente 1.3 umoles/g, es el tejido de mayor contenido y variedad en estos esfingolípidos, los cuales han sido encontrados sólo en animales (tabla 1).

Los terminales nerviosos o sinaptosomas constituyen una formación muy especial del sistema nervioso, a través de la cual se transmite el impulso nervioso de una neurona a otra. Eichberg, Whittaker y Dawson (1964); Seminario, Hren y Gómez (1964) y Rubiolo de Maccioni y Caputto (1968) demostraron que en los sinaptosomas la concentración de gangliósidos es particularmente alta (tabla 2). ¿Significa ésto que los gangliósidos cumplen una función especial o específica en este tejido? La pregunta no puede ser res-

TABLA 1

Concentración de gangliósidos en diferentes tejidos

Tejido	mg gangliósido/g tejido seco
Materia gris de cerebro humano	14,7 [1]
Materia blanca de cerebro humano	2,9 [1]
Médula adrenal (vaca)	3,8 [2]
Placenta humana.........................	1,2 [3]
Músculo (conejo)........................	0,2 [4]
Estroma eritrocitos (conejo)	0,5 [5]

[1] Calculado en base a datos de Ledeen y otros (1968) teniendo en cuenta que 1 mg de la mezcla de gangliósidos de cerebro contiene aproximadamente 1 umol de NANA (ácido N- acetil neuramínico o siálico).

[2] Ledeen y otros (1968).

[3] Svennerholm (1965).

[4] Calculado en base a los datos de Lassaga y otros (1967) teniendo en cuenta que 1,3 mg de la mezcla de gangliósidos de músculo contiene aproximadamente 1 umol de NANA.

[5] Lassaga, Albarracín de Lassaga y Caputto (en preparación).

TABLA 2

Contenido de gangliósidos en diferentes partículas subcelulares de cerebro de cobayo *

Fracción subcelular	mg NANA/g cerebro húmedo
Mielina.............	0,050
Sinaptosomas	0,100
Mitocondrias	0,006
Microsomas	0,040

* Eichberg y otros (1964).

pondida en forma definitiva al presente, pero ciertamente se están acumulando evidencias de que, al igual que otros lípidos de membrana, desempeñan un rol importante durante la actividad nerviosa.

LOS GANGLIOSIDOS DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El estudio de los cambios bioquímicos en el cerebro durante la maduración permite establecer posibles relaciones entre los gangliósidos y el desarrollo de estructuras morfológicas específicas, y

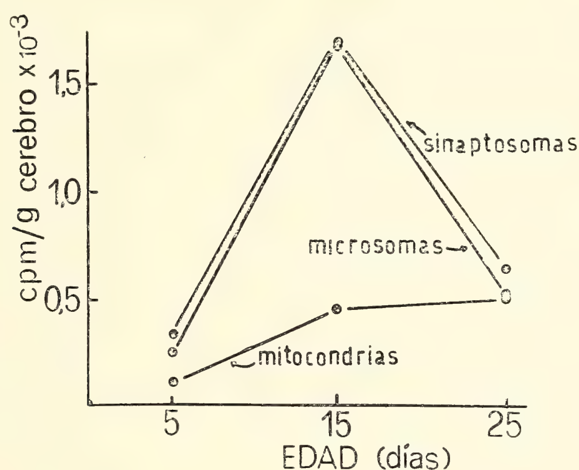


Fig. 2. — Incorporación de radiactividad en la mezcla total de gangliósidos de cerebro de rata en función de la edad a 12 horas de inyectar glucosamina ^{14}C

sugiere nuevamente la participación de estos esfingolípidos en la función cerebral. Así, el período de mayor velocidad en la síntesis de los gangliósidos en cerebro de rata, ocurre entre el quinto y el décimoquinto día de vida; la velocidad de depósito cae luego en forma abrupta, tanto en el cerebro total como en los sinaptosomas y microsomas, siendo en el día vigésimo quinto alrededor de $^1/_3$ del valor que se observa alrededor de día décimo quinto (Burton, García Buñuel, Golden y Balfour, 1963; Rubiolo de Maccioni y Caputto, 1968) (fig. 2). Estos datos mostraron que la etapa de máxima velocidad de depósito de los gangliósidos coincide aproximadamente con la de mayor desarrollo neuronal y precede a la etapa de mielinización (Mc Ilwain, 1955; Zeman y Maitland Innes,

1963). Los factores que determinan los cambios de velocidad de síntesis de los gangliósidos son poco conocidos; en lo que respecta a la disminución que se observa en ratas mayores de 20 días, puede ser explicada por el hallazgo en nuestro laboratorio de un inhibidor de la siatil-transferasa (hematósido sintetasa) cuya concentración aumenta a medida que la rata envejece (Duffard y Caputto, comunicación personal).

La deposición de los gangliósidos en las distintas estructuras subcelulares durante el desarrollo ha sido investigada por Spence y Wolfe (1967) y también en nuestros laboratorios (Rubiolo de Maccioni y Caputto, 1968). Nuevamente los resultados indicaron que el depósito de los gangliósidos es un proceso anterior a la mielinización. La cantidad total de estos esfingolípidos presentes en las fracciones sinaptosomal, mitocondrial y microsomal aumenta alrededor de 2,5 veces desde el día 3º al día 25º de vida de la rata. La cuantificación de los sinaptosomas y mitocondrias durante el mismo período ya sea por peso o por contenido de proteínas, mostró también un aumento que oscilaba entre 2 y 2,5 veces, lo que indicaría que el contenido porcentual de los gangliósidos en estas organelas no cambia ostensiblemente durante el desarrollo y que los mismos son componentes obligados de las partículas. Algunos autores (Suzuki, 1965; Vanier, Holm, Ohman y Svennerholdm, 1971; Schengrund y Rosenberg, 1971) han observado que la proporción relativa de cada especie gangliosídica en la mezcla total de gangliósidos varía cuando se pasa del período embrionario al estado adulto.

RELACIONES ENTRE LA SINTESIS DE LOS GANGLIOSIDOS Y LAS PARTICULAS QUE LOS SINTETIZAN

Los fosfolípidos al igual que los gangliósidos, son componentes estructurales de membranas. Sin embargo el mecanismo por el cual estos compuestos llegan al sitio en el que forman parte de la estructura parece ser fundamentalmente distinta en ciertos fosfolípidos y en los gangliósidos. Los fosfolípidos son sintetizados en microsomas y desde éstos pasan a formar parte de otras partículas, tales como las mitocondrias, las cuales no tienen las enzimas necesarias para sintetizarlos (Mc Murray y Dawson, 1969; Jungalwala, Freinkel y Dawson, 1971). Los gangliósidos, en cambio, parecen ser sintetizados en cada una de las partículas que los poseen. Ru-

biolo de Maccioni y Caputto (1968) y Harzer, Jatzkewitz y Sandhoff (1969) encontraron que cuando una rata es inyectada con glucosamina ^{14}C o glucosa ^{14}C las partículas subcelulares de cerebro incorporan radiactividad en sus gangliósidos simultáneamente y nó secuencialmente, de lo cual se concluyó que cada organela es capaz de sintetizar independientemente sus propios gangliósidos.

Los resultados *in vitro* de Arce, Maccioni y Caputto (1971) e *in vivo* de Maccioni, Arce y Caputto (1971) demuestran que la compartimentación a que están sometidos los gangliósidos es aún mucho más rígida que el simple hecho de quedar ligados a las partículas que los sintetizan; hay buenas evidencias de que las etapas comunes en la formación de los diferentes gangliósidos en una misma partícula no forman un "pool" común, sino que están compartimentizadas. Así por ejemplo un gangliósido menos complejo como el hematósido puede ser producto final, es decir, estar destinado a desempeñar su papel en la membrana como hematósido, o puede ser un producto intermediario en la formación de un gangliósido más complejo. En estos momentos no existen procedimientos químicos que permitan separar el hematósido "intermediario" del hematósido "final"; sin embargo, se han realizado experimentos *in vivo* usando como precursor radiactivo glucosa ^{14}C y/o glucosamina ^{3}H, e *in vitro* usando precursores que contenían H-acetilgalactosamina ^{14}C o siálico ^{3}H, en los cuales las relaciones de radiactividad incorporada en los gangliósidos más complejos y el hematósido demuestran que el *pool* de hematósido producto final y el *pool* de hematósido intermediario no se mezclan entre sí. Esta compartimentación tan estricta de los gangliósidos sugiere que cada uno de ellos se sintetiza con los requerimientos específicos del lugar y del momento en que se forman.

¿TIENEN "TURN OVER" PARCIALES LOS GANGLIOSIDOS?

Algunos gangliósidos tienen unidades estructurales que se repiten en la molécula; ellas son el ácido siálico y la galactosa. Por combinaciones de métodos químicos y enzimáticos se pueden separar tanto los dos ácidos siálicos entre sí como las dos galactosas entre sí. El estudio en ratas de 18 días, de la incorporación de radiactividad en estos componentes con precursores radiactivos permitió comprobar que tanto los dos o tres ácidos siálicos entre ellos como las dos galactosas entre ellas tenían prácticamente la misma

radiactividad específica a todos los tiempos estudiados (Maccioni, Arce y Caputto, 1971). Esto indica que en la rata de 18 días la proporción de gangliósidos que se reedifican *in vivo* a partir de productos de degradación en los que subsiste uno de los dos ácidos siálicos o una de las dos galactosas es relativamente pequeña con respecto al total de gangliósidos que se sintetizan *de novo* o se reedifican a partir de glucosilceramida o precursores aún más simples.

Kanfer y Richards (1967) en experimentos en que se inhibió la síntesis de proteínas con puromicina, encontraron que también se inhibía la síntesis de gangliósidos. Presumiendo que la puromicina es un inhibidor específico de síntesis de proteínas, Kanfer y Richards interpretaron su experimento en el sentido de que no se sintetizan gangliósidos si simultáneamente no se sintetizan las proteínas sobre las cuales ellos se asientan.

EFECTO DE LA ESTIMULACION SENSORIAL SOBRE LA INCORPORACION DE RADIACTIVIDAD EN LOS GANGLIOSIDOS USANDO COMO PRECURSOR GLUCOSAMINA 6-H^3

Recientemente, Irwin y Samson (1971) han comunicado que el recambio que sufren los gangliósidos y aún el contenido de los mismos es afectado por variaciones en la actividad cerebral.

En nuestro laboratorio se ha intentado conocer si los gangliósidos están involucrados de alguna manera en el funcionamiento del tejido nervioso determinado por la estimulación sensorial (Maccioni, Giménez y Caputto, 1971). Para ello se usaron ratas mantenidas en completa oscuridad y en baja estimulación sonora por espacio de 4 días, al cabo de los cuales, la mitad de los animales fue inyectada con glucosamina tritiada y inmediatamente estimulada con luz y sonido, mientras la otra mitad, que había sido igualmente inyectada, permanecía en oscuridad (controles). Al cabo de 1 hora, tanto los animales estimulados como los controles, fueron sacrificados y sus cerebros extraídos. Pero el estudio de la incorporación del ^3H en los gangliósidos, no se realizó obteniéndolos del cerebro total, sino que se los extrajo y purificó a partir de las partículas subcelulares del cerebro; esto se hizo así dado que la existencia de una síntesis independiente de los mismos en cada una de las diferentes organelas, hacía posible suponer que dichas organelas podrían modificar en forma diferente sus metabolismos en respues-

ta a la actividad cerebral y que por lo tanto las diferencias se apreciaran mejor en una clase de partículas que en cerebro total.

Se hicieron dos series de experimentos; en una la vía de inyección fue la intracerebral, mientras que en la otra, fue la intraperitoneal. Las determinaciones fueron realizadas desconociendo el investigador a qué grupo pertenecía cada animal. Los resultados obtenidos usando una u otra vía de inyección fueron esencialmente los mismos.

Cuando se usó la vía de inyección intracerebral, la gran dispersión de los valores de la radiactividad presente en el cerebro total, aún dentro de un grupo de ratas hermanas, hizo imposible comparar las actividades específicas de los gangliósidos de las partículas subcelulares (cpm/umol NANA) obtenidas de animales sometidos a estimulación sensorial con las de los animales mantenidos en oscuridad. Pero cuando, para obviar este problema, se compararon las relaciones de las actividades específicas de los gangliósidos de una partícula subcelular respecto a otra de un mismo animal, se encontró que las relaciones

$$\frac{\text{mitocondrias}}{\text{sinaptosomas}} \text{ ó } \frac{\text{mitocondrias}}{\text{microsomas}}$$

eran significativamente mayores en los animales expuestos a estimulación sensorial que las obtenidas de animales no expuestos.

Al usarse la vía de inyección intraperitoneal se observó que la dispersión de los valores de radiactividad presente en el cerebro total dentro de un grupo de animales hermanos era mucho menor que cuando se usaba la vía intracerebral. Estos experimentos permitieron confirmar las diferencias entre las relaciones de actividades específicas de gangliósidos provenientes de diferentes partículas y además demostraron que el factor más importante en la determinación de tales diferencias era la disminución en la actividad específica que presentaron los gangliósidos de los sinaptosomas de animales expuestos a una mayor estimulación. Asimismo se observó un incremento menor en la actividad específica de las mitocondrias (tabla 3).

TABLA 3

Efecto de la estimulación sensorial sobre la incorporación de glucosamina 6-^3H en gangliósidos de cerebro de rata

Partículas subcelulares		Δ % (Término medio ± error st.)	p
Mitocondrias	(45)	+11 ± 5	< 0,05
Sinaptosomas	(43)	—15 ± 5	<0,01
Microsomas	(44)	— 0,4 ± 4	n. s.
Mitocondrias/Sinaptosomas	(44)	+49 ±13	<0,001
Mitocondrias/Microsomas	(43)	+20 ± 8	<0,05
Sinaptosomas/Microsomas	(42)	+13 ± 6	<0,05

Los resultados están expresados como diferencias porcentuales de las actividades específicas o de las relaciones de actividades específicas de gangliósidos de partículas subcelulares provenientes de animales sometidos a estimulación sensorial respecto a las de animales mantenidos en oscuridad ; los números entre paréntesis son números de determinaciones; p fue calculada por el test de Student para datos correlacionados.

Otro experimento que se realizó fue semejante al anterior pero variando el tiempo, es decir, se inyectó a los animales con el precursor radiactivo y se los expuso por tres horas a la estimulación sensorial incrementada. No se encontraron diferencias entre animales estimulados y controles.

Radiactividad de los homogeneizados totales del cerebro

Se intentó también conocer si los cambios observados obedecían a diferencias en la cantidad de compuesto radiactivo presente en el cerebro. Para ello se determinó la radiactividad total presente en los homogeneizados totales de los cerebros de animales estimulados y controles, no encontrándose diferencias significativas entre ellos.

EFECTO DE LA ESTIMULACION SENSORIAL SOBRE LA INCORPORACION DE RADIACTIVIDAD EN LOS GANGLIOSIDOS DE ANIMALES DE HABITOS DIURNOS

Dado que la actividad específica de los gangliósidos de sinaptosomas es menor en ratas expuestas a mayor intensidad luminosa que en las mantenidas en oscuridad y que estos animales son de hábitos nocturnos, se consideró de interés estudiar si un animal de hábitos diurnos como el pollo, respondía en forma similar u opuesta.

En nuestro laboratorio se están realizando experiencias con pollos mantenidos en oscuridad por 4 días, al cabo de los cuales se los inyecta con glucosamina tritiada. Inmediatamente la mitad de los animales es llevada a la luz por 1 hora, mientras la otra mitad, que sirve de control, permanece en oscuridad.

Los resultados, aún preliminares, indican que se produce un incremento significativo en la incorporación del precursor radiactivo en los gangliósidos de sinaptosomas provenientes de pollos expuestos a la luz, respecto a los que permanecen en oscuridad.

BIBLIOGRAFIA

Arce, A., Maccioni, H. J. y Caputto, R. (1971). Biochem. J. *121*, 483.
Balakrishnan, S. y Mc Ilwain, H. (1961). Biochem. J. *81*, 72.
Burton, R. M., García Buñuel, L., Golden, M. y Balfour, Y. H. (1963). Biochemistry, Easton *2*, 580.
Eichberg, J., Whittaker, V. P. y Dawson, R. M. C. (1964). Biochem. J. *92*, 91.
Harzer, K., Jatzkewitz, H. y Sandhoff, K. (1969). J. Neurochem. *16*, 1279.
Irwin, L. N. y Samson, F. E. jun. (1971). J. Neurochem. *18*, 203.
Jungalwala, F. B., Freinkel, N. y Dawson, R. M. C. (1971). Biochem. J. *123*, 19.
Kaufer, J. y Richards, R. L. (1967). J. Neurochem. *14*, 513.
Kuhn, R. y Wiegandt, H. (1963 *a*). Chem. Ber. *96*, 866.
— (1963 *b*). Z. Naturforsch *18* b, 541.
Lassaga, F. E., Albarracín de Lassaga, I. y Caputto, R. (1967). Anales Asoc. Quím. Argentina *55*, 309.
Ledeen, R., Salsman. K. y Cabrera, M. (1968). Biochemistry *7*, 2287.
Maccioni, A. H. R., Giménez, M. S. y Caputto, R. (1971). J. Neurochem. (planeado para vol. 18, pág. 2363).
Maccioni, H. J., Arce, A. y Caputto, R. (1971). Biochem. J. (planeado para vol. 125, pág. 1131).
Mc Ilwain, H. (1955). Biochemistry and the Central Nervous System p. 180, Churchill, London.
Mc Murray, W. C. y Dawson, R. M. C. (1969). Biochem. J. *112*, 91.

Mellanby, J. y Whittaker, V. P. (1968). J. Neurochem. *15*, 205.
Rubiolo de Maccioni, A. H. y Caputto, R. (1968). J. Neurochem. *15*, 1257.
Scheugrund, C. L. y Rosenberg, A. (1971). Biochemistry *10*, 2424.
Seminario, L., Hren, N. y Gómez, C. J. (1964). J. Neurochem. *11*, 197.
Simpson, L. L. y Rapport, M. M. (1971). J. Neurochem. *18*, 1341.
Spence, M. W. y Wolfe, L. S. (1967). Can. J. Biochem. *45*, 671.
Suzuki, K. (1965). J. Neurochem. *12*, 969.
Svennerholm, L. (1965). Acta Chem. Scand. *19*, 1506.
Van Heyningen, W. E. (1959). J. gen. Microbiol. *20*, 291.
Vanier, M. T., Holm, M., Ohman, R. y Svennerholm, L. (1971). J. Neurochem. *18*, 581.
Wooley, D. W. y Gommi, B. W. (1964). Nature, Lond. *202*, 1074.
— (1965). Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. *53*, 959.
Zeman, W. y Maitland Innes, J. R. (1963). Craigie's Neuroanatomy of the rat p. 43, Academic Press, N. York.

Comisión de Redacción de los

ANALES DE LA SOCIEDAD CIENTIFICA ARGENTINA

Dr. Jorge A. L. Brieux
Ing. Agr. Arturo Burkart
Dr. Horacio H. Camacho
Dr. Pedro Cattaneo
Ing. Roberto D. Cotta
Cap. de Fragata (R) Luis M. de la Canal
Dr. José M. Gallardo
Dr. Juan A. Izquierdo
Clmte. (R) Rodolfo N. M. Panzarini
Ing. Agr. José A. Pastrana
Dr. Luis A. Santaló
Dr. Otto Schneider
Dr. José Federico Westerkamp

NORMAS PARA LOS AUTORES

1. ANALES publica unicamente trabajos originales e inéditos ; solamente por excepción podrá incluir trabajos cuya noticia se haya dado por otra publicación.
2. La publicación en ANALES es gratuita. Las separatas que soliciten los autores (o las entidades a que estén vinculados) son con cargo a los mismos. El requerimiento deberá hacerse por escrito y antes de iniciar la impresión.
3. Los autores son personalmente responsables de la tesis y del contenido de sus trabajos y deberán realizar las correcciones de las pruebas de imprenta de dichos trabajos.
4. La Sociedad Cientifica Argentina se reserva el derecho de rechazar cualquier trabajo que sea sometido para publicación en ANALES, si así lo considerara conveniente.
5. Los trabajos deberán ser presentados escritos a máquina, a doble espacio, en papel tamaño oficio o carta, utilizando una sola de las caras del papel y redactados en castellano. Las fórmulas podrán ir manuscritas y deberán ser suficientemente claras para la labor de la imprenta. Los gráficos se dibujarán en tinta china, o por otro medio, de manera tal de permitir la fácil y buena preparación de los clisés ; esto último es aplicable a todo tipo de ilustración. La cantidad será la mínima compatible con las necesidades de la buena comprensión del trabajo.
6. Los trabajos, luego de su título, llevarán un resumen en castellano y otro en idioma extranjero, éste último de no más de 150 palabras. Dichos resúmenes deberán señalar el problema planteado, la indicación de los procedimientos y procesos y las conclusiones a que se arribe, y hacer referencia sobre la precisión de los resultados, todo ello de manera sintética.
7. Los escritos originales, destinados a la Dirección de ANALES, serán remitidos a la Administración de la Sociedad, Avenida Santa Fe 1145, Capital Federal, a efectos de registrar fecha de entrega y posterior envío al Director.
8. La publicación de los trabajos, una vez aceptados, estará sujeta a las posibilidades de la Sociedad y a las exigencias de diagramación de ANALES. La Sociedad se reserva el derecho de determinar la entrega de ANALES en la cual aparecerán los trabajos.


SMITHSONIAN INSTITUTION LIBRARIES
3 9088 01357 3779

Correo Argentino Cent. (B)	FRANQUEO PAGADO Concesión N° 1186
	TARIFA REDUCIDA Concesión N° 6247